
UNTERSUCHUNGEN ZUR pH-UNABHÄNGIGEN MEMBRANFUSION DES HUMANEN CYTOMEGALIEVIRUS

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/ Lahn
vorgelegt von

Dorothee Gicklhorn
aus Marburg/ Lahn

Marburg/ Lahn 2002

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1998 bis Oktober 2001 im Institut für Virologie, Fachbereich Medizin, der Philipps- Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. K. Radsak durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 28.02.2002 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Radsak

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2002

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zum überwiegenden Teil in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Gicklhorn, D., Eickmann, M. & Radsak, K. (1999). Chloramphenicol acetyltransferase expression as a sensor for fusion activity.
BioTechniques **27**, 902-8

Gicklhorn, D., Eickmann, M., Ohlin, M. & Radsak, K. (2002). Inhibition of HCMV-mediated cell-cell-fusion by glycoprotein-specific antibodies.
(Manuskript in Vorbereitung).

Weitere Veröffentlichungen:

Gicklhorn, D., Eickmann, M., Giesendorf, B., Hauser, H.P. & Radsak, K. (1999). Immunreactive parts of the glycoprotein gpII from Varicell-Zoster-Virus.
Europa-Patent: EP0927760, A3

Giesendorf, B., Hauser, H.P., Eickmann, M., Radsak, K. & Gicklhorn, D. (2001). Varicella zoster virus (VZV) immunoreactive protein VP26 and its diagnostic use.
Europa-Patent: EP0927759, A3

Müller, T.F., Gicklhorn, D., Jungraithmayr, T., Eickmann, M., Lange, H., Radsak, K. & Reschke, M. (2002). Pattern and persistence of the epitope-specific IgM response against human cytomegalovirus in renal transplant patients.
J. Clin. Virol. **24**, 45-56

Meyer, G., Gicklhorn, D., Strive, T., Radsak, K. & Eickmann, M. (2002). A three residue signal confers localization of a reporter protein in the inner nuclear membrane.
Biochem.Biophys. Res. Com. (eingereicht).

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie	1
1.2 Medizinische Aspekte	2
1.2.1 Epidemiologie	2
1.2.2 Krankheitsverläufe	3
1.2.3 Therapeutische Ansätze	4
1.3 Biologische Aspekte	4
1.3.1 Virionstruktur	4
1.3.2 Genomstruktur	5
1.3.3 Viraler Infektionszyklus	7
1.4 Herpesvirale Membranglykoproteine	10
1.4.1 Homologien und Funktion	11
1.4.2 Membranglykoproteine des Humanen Cytomegalievirus	12
1.5 Fusogene virale Glykoproteine	17
1.5.1 Herpesvirale Adsorption und Fusion	17
1.5.2 Fusionsmechanismen	19
2. Problemstellung	21
3. Material	22
3.1 Geräte	22
3.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.3 Chemikalien und Biochemikalien	23
3.4 Antibiotika	25
3.5 Kulturmediengrundstoffe	25
3.6 Enzyme	25
3.7 Radioaktive Verbindungen	26
3.8 Antikörper	26
3.9 Kits	28
3.10 Medien	28
3.11 Puffer	29
3.12 Zellkultur und Virusstämme	30
3.12.1 Primäre humane Hautfibroblasten	30
3.12.2 Astrocytoma-Zellen (U373)	30

3.12.3 Cos7-Zellen	30
3.12.4 Virusstämme	30
3.13 Bakterienstämme	30
3.13.1 <i>E.coli</i> XL1-Blue	30
3.13.2 <i>E.coli</i> BL21	31
3.13.3 <i>E.coli</i> JM 109	31
3.13.4 <i>E.coli</i> SSC110	31
3.14 Plasmide und Vektoren	31
3.14.1 Der Reportergen-Vektor pG5CAT	31
3.14.2 Der Vektor pM3-VP16	32
3.14.3 Der Vektor pGEX-6P-1	33
3.14.4 Das eukaryotische Expressionskonstrukt pRc/CMV-gB	34
3.14.5 Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 myc/his	35
3.14.6 Das eukaryotische Expressionskonstrukt pRc/CMV-gH	36
3.14.7 Der Vektor pIG-1	37
3.14.8 Das Vektorkonstrukt pBlue-VSV-G	37
3.14.9 Der Vektor pGEM [®] -T	38
3.15 Oligonukleotide	39
3.15.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung	39
3.15.2 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
4. Methoden	41
4.1 Molekularbiologische Standardverfahren	41
4.1.1 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA	41
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
4.1.3 Endonuklease Restriktion von DNA	42
4.1.4 Fällern und Konzentrieren von Nukleinsäuren	43
4.1.5 Agarosegel-Elektrophorese	43
4.1.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	44
4.1.8 Transformation von <i>E.coli</i>	45
4.1.9 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Abschnitten	46
4.1.10 Sequenzierung von DNA	48
4.2 Expression rekombinanter Proteine	50
4.2.1 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen	50

4.3 Zellbiologische Methoden	52
4.3.1 Zellkulturtechniken	52
4.3.2 Herstellung von Zellextrakten	54
4.3.3 Virusanzüchtung	54
4.3.4 Herstellung von [³⁵ S]-markiertem AD 169	56
4.3.5 Attachment-Assay	57
4.3.6 Transfektionstechniken	58
4.3.7 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien	59
4.3.8 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Assay	60
4.4 Proteinchemische Methoden	61
4.4.1 SDS-Polyacrylamid Elektrophorese (SDS-PAGE)	61
4.5 Immunologische Methoden	63
4.5.1 Immunoblot	63
4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz	65
4.5.3 Ammoniumsulfat-Präzipitation von Antikörper-Lösungen	66
4.5.4 ELISA zur Quantifizierung humaner Immunglobuline (Ig)	67
5. Ergebnisse	69
5.1 Etablierung eines Fusionsassays zur Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion	69
5.1.1 Prinzip des CAT-Reportergen-Aktivierungs-Assay	70
5.1.2 CAT-Expression im transienten System	71
5.1.3 Herstellung stabil exprimierender U373-Transaktivator-Zellen und Reportergen-Zellen	73
5.1.4 Überprüfung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion im Reportergen-Aktivierungs-Assay	74
5.1.5 Quantifizierung von HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusionen	77
5.1.6 Identifizierung der am Fusionsvorgang beteiligten Glykoproteine	79
5.1.7 Untersuchung transient exprimierter Glykoproteine im Fusions-Assay	87
5.1.8 Untersuchung coexprimierter Glykoproteine im Fusions-Assay	87
5.2 Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion mit Glykoprotein-spezifischen Antikörpern	89
5.2.1 Modifizierung des Fusions-Assay zur Untersuchung der Fusionsinhibierung	89
5.2.2 Fusionsinhibierung durch Glykoprotein B- und H-spezifische Antikörper	91
5.2.3 Fusionsinhibierung durch monoklonale humane gB-spezifische Antikörper	93
5.2.4 Fusionsinhibierung durch gB-spezifische Antikörper bei konstanter IgG-Konzentration	95

5.3 Untersuchungen zum Fusions-Mechanismus	97
5.3.1 Etablierung eines "Attachment"-Assays unter AK-Einfluss	98
5.3.2 Differenzierung zwischen HSPG-Bindung und Rezeptorbindung	100
5.3.3 Attachment-Assay unter AK-Einfluss und Heparinablösung	100
5.4 Untersuchungen unter Verwendung des rekombinanten AD 2-Epitops	102
5.4.1 Herstellung des Konstrukts pGEX-gB-AD 2	103
5.4.2 Bakterielle Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins GST-AD 2 und GST	104
5.4.3 Bindung des Fusionsproteins GST-AD 2 an U373-Zellen	105
5.4.4 Fusions-Assay nach GST-AD 2-Bindung	107
6. Diskussion	109
6.1 Etablierung eines Fusionsassays zur Untersuchung der HCMV- vermittelten Zell-Zell-Fusion	109
6.2 Identifizierung der am Fusionsvorgang beteiligten Glykoproteine	111
6.3 Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion mit Glykoprotein-spezifischen Antikörpern	114
6.4 Untersuchungen zum Fusions-Mechanismus	116
6.5 Untersuchung des rekombinanten AD 2-Epitops	118
6.6 AD 2 und fusionsaktive Konformation des HCMV-gB	119
6.7 Ausblick	119
7. Zusammenfassung	121
8. Literaturverzeichnis	123
9. Abkürzungsverzeichnis	137
Danksagung	138
Erklärung	139

1 Einleitung

1.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) wird gemäß der Klassifikation des Internationalen Komitees für Virustaxonomie (Roizman *et al.*, 1981) der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet. Diese Virusfamilie umfasst bisher über 100 beschriebene Spezies, darunter acht humanpathogene (Tab. 1).

Herpesviren sind umhüllte, ikosaedrische Viren mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom, das im Zellkern der infizierten Zelle mit Hilfe der viruskodierten DNA-Polymerase repliziert wird. Die Bildung von Tochterviren führt zur Lyse der infizierten Zelle. Zudem sind alle Herpesviren in der Lage nach Primärinfektion latent im Wirt zu persistieren.

Die Herpesviren werden aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften, die sich auf das Wirtsspektrum, die Dauer ihres Replikationszyklus sowie die spezielle Cytopathologie und den Ort ihrer Persistenz beziehen in drei Subfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt (Roizman *et al.*, 1992) (Tab.1).

Die α -*Herpesvirinae*, deren bekanntester Vertreter das Herpes-Simplex-Virus (HSV) ist, zeichnen sich durch ein relativ breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. Diese Viren sind *neurotrop* und persistieren in sensorischen Ganglien des Wirtes.

Die β -*Herpesvirinae*, zu denen das HCMV gehört, sind durch eine strikte Spezies- und Zelltypspezifität, sowie einen langsamen Replikationszyklus gekennzeichnet. Sie sind *lymphotrop* und können in Lymphozyten und mononukleären Zellen, aber auch in anderen Geweben und verschiedenen Organen, wie z.B. der Niere persistieren. Die Vergrößerung der infizierten Zellen ist verantwortlich für die Namensgebung (Cytomegalie).

Die γ -*Herpesvirinae*, zeigen eine ausgeprägte Gewebsspezifität, sie infizieren vorwiegend B- und T-Lymphozyten und persistieren in lymphoiden Geweben.

Charakteristische Vertreter dieser Subfamilie sind das Epstein-Barr-Virus und das Kaposi-Sarkoma assoziierte Virus (HHV-8), die onkogene Eigenschaften aufweisen.

Tabelle 1: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren (Roizman *et al.*, 1992)

Subfamilie	Art	Ab- kürzung	Literatur
α -Herpesvirinae	Herpes Simplex Virus 1	HSV 1	(Gruter, 1924)
	Herpes Simplex Virus 2	HSV 2	(Schneeweis, 1962)
	Varizella-Zoster Virus	VZV	(Dumas <i>et al.</i> , 1980)
β -Herpesvirinae	Humanes Cytomegalievirus	HCMV	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6	(Lindquester & Pellett, 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7	(Frenkel <i>et al.</i> , 1990)
γ -Herpesvirinae	Epstein-Barr Virus	EBV	(Epstein <i>et al.</i> , 1965)
	Humanes Herpesvirus 8	HHV 8	(Chang <i>et al.</i> , 1994)

1.2 Medizinische Aspekte

1.2.1 Epidemiologie

Das HCMV, für das der Mensch der einzige Wirt ist, verursacht weltweit endemische Infektionen. Die Übertragung des Virus erfolgt über Tröpfchen- und Schmierinfektionen, über die Muttermilch, über diaplazentare Infektionen, sowie über Organtransplantationen und Bluttransfusionen. Die oben genannten Infektionswege sind die Ursache dafür, dass in Entwicklungsländern 86% der Kinder bis zum ersten Lebensjahr serokonvertiert sind (Bello & Whittle, 1991).

In den westlichen Ländern liegt die Durchseuchungsrate in der Gruppe der 20-jährigen bei 20% und in der Gruppe der über 40-jährigen bei 50-80% (Britt & Alford, 1996).

Nach der Primärinfektion persistiert das Virus latent im Organismus, wobei die Latenz durch Reaktivierungen unterbrochen werden kann.

1.2.2 Krankheitsverläufe

Ausschlaggebend für den klinischen Verlauf ist der Zeitpunkt der Infektion und der Immunstatus des Infizierten. Bei immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion meist *asymptomatisch*, während es bei Immunsupprimierten und bei pränatalen Infektionen zu schweren klinischen Verlaufsformen kommen kann. Bei Patienten mit Immunsuppression nach Organ- oder Knochenmarks-Transplantationen können im Gefolge einer Reaktivierung des Virus, schwere klinische Symptome wie Hepatiden oder Pneumonien (Britt & Alford, 1996) auftreten, die zur Organabstoßung und sogar zum Tode führen können.

Eine Primärinfektion oder Reaktivierung bei Personen mit erworbenem Immundefizienz-Syndrom (AIDS) kann ebenfalls zu ausgeprägten Krankheitsbildern bis hin zum Tod führen. Dabei stehen Infektionen der Retina, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und des Zentralnervensystems im Vordergrund (Drew, 1992).

Pränatale Infektionen, als Folge einer Primärinfektion der Mutter, führen bei etwa 5% der infizierten Neugeborenen zu schweren Schädigungen, die sich u.a. in Hydrozephalie, Hepatosplenomegalie, Meningitis und Chorioretinitis äußern. Ferner kann es zu Spätschäden wie Taubheit und Entwicklungsstörungen kommen, die erst im Kleinkindalter zu Tage treten (Britt *et al.*, 1991). Beim kongenitalen Cytomegaliesyndrom (Doerr, 1987), der schwersten Form der pränatalen HCMV-Infektion, überleben 20-30% der Kinder das erste Lebensjahr nicht.

1.2.3 Therapeutische Ansätze

Als antivirales Chemotherapeutikum zur Behandlung akuter HCMV-Infektionen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, steht Ganciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin) zur Verfügung. Es wird nach Phosphorylierung durch die virale Kinase pUL97 aktiviert (Sullivan *et al.*, 1992) und wirkt als Inhibitor der viralen DNA-Polymerase (Matthews & Boehme, 1988; Oram & Herold, 1998). Weitere Substanzen wie Foscarnet (Phosphonoameisensäure) und Cidovir (ein Nukleotidanaloga), die ebenfalls inhibierend auf die virale DNA-Polymerase wirken, sind aufgrund auftretender Nebenwirkungen weniger geeignet. Zudem führt der Einsatz antiviraler Chemotherapeutika zur Selektion resistenter HCMV-Stämme, die Mutationen in den Genen der UL97-Kinase und der DNA-Polymerase aufweisen (Lurain *et al.*, 1992; Michel *et al.*, 1998).

Eine passive Immunprophylaxe kann durch Gabe von Anti-HCMV Gamma-Immunglobulinen erfolgen. Ein wirksamer aktiver Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht.

1.3 Biologische Aspekte

1.3.1 Virionstruktur

Das 200 nm große Virion weist die typische Herpesvirusarchitektur, bestehend aus dem Viruskern, dem Nukleokapsid, dem Tegument und der viralen Hüllmembran, auf (Abb. 1). Der elektronendichte Viruskern mit einem Durchmesser von etwa 64 nm setzt sich aus dem 230 Kilobasenpaar großen, doppelsträngigen DNA-Genom und assoziierten Proteinen zusammen (Wright *et al.*, 1964). Dieser wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Kern und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid, das in eine amorphe Proteinmatrix, die fast ausschließlich aus Phosphoproteinen besteht und als Tegument bezeichnet wird, eingebettet ist.

Das Phosphoprotein pp65 kann dabei bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson & Irmieri, 1984). Die aus Wirtszellmembranen abgeleitete Virushülle besteht aus einer etwa 11 nm dicken Lipiddoppelschicht (Tooze *et al.*, 1993), in die neben zellulären vor allem virale Glykoproteine eingelagert sind.

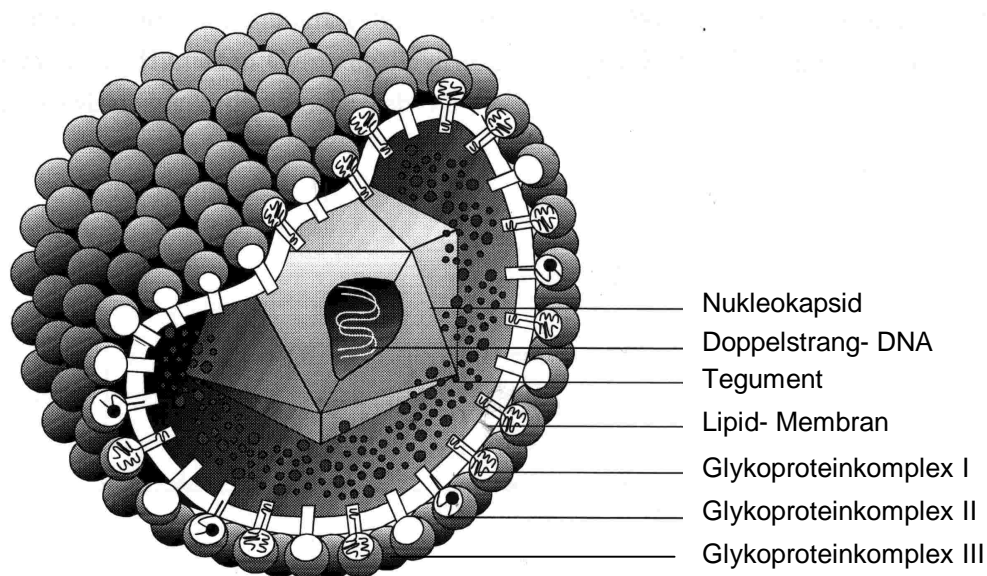


Abb. 1 Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV)
(©M. Reschke).

1.3.2 Genomstruktur

Das HCMV-Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von etwa 230 Kilobasen (kb) Länge mit einem GC-Gehalt von etwa 59% und ist damit das größte aller humanpathogener Herpesviren. Es ist in zwei unterschiedlich lange nicht-repetitive Segmente (U_L = unique long, U_S = unique short) unterteilt, die jeweils von zwei invertierten repetitiven Sequenzabschnitten (TR_L , TR_S = terminal repeat long bzw. short; IR_L , IR_S = internal repeat long bzw. short) eingerahmt werden (Abb. 2). Die beiden Segmente können in unterschiedlichen Orientierungen zueinander vorliegen, so dass insgesamt vier Isoformen des

Genoms existieren, die in äquimolaren Mengen in allen Viruspopulationen vorliegen (Stinski *et al.*, 1981; Dutch *et al.*, 1992).

An den Enden des Virusgenoms und an der Verbindungsstelle zwischen den Segmenten U_L und U_S finden sich weitere Sequenzbereiche, die als „a-Sequenz“ bezeichnet werden und in denen die konservierten Erkennungsregionen für die Prozessierung und Verpackung der Virus-DNA lokalisiert sind (McVoy *et al.*, 1998).

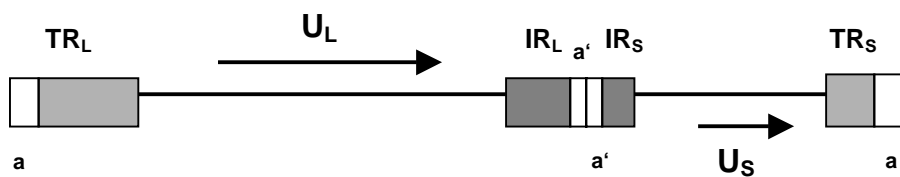


Abb. 2 Schematische Darstellung eines HCMV-Genoms

Dargestellt ist die Prototyp-Genom-Isoform. Die Pfeile veranschaulichen die Orientierung der Segmente zueinander

Das Genom des Laborstammes AD169 ist vollständig sequenziert (Chee *et al.*, 1990). Aus der Sequenzanalyse lassen sich 208 offene Leserahmen ableiten, von denen 57 potentielle Glykoproteine kodieren. Die Nomenklatur der viralen Genprodukte basiert, ausgehend von einer definierten Prototyp Genom-Isoform (Chee *et al.*, 1990), auf der fortlaufenden Nummerierung der potentiellen Leserahmen, gemäß ihrer Lokalisation auf dem U_L oder U_S -Segment. Für virale Proteine, Phosphoproteine und Glykoproteine werden die Abkürzungen p, pp und gp verwendet. So wird beispielsweise das Glykoprotein B auch als gpUL55 bezeichnet, da der 55. offene Leserahmen des U_L Segments für das Glykoprotein B kodiert.

Bislang konnten erst wenige Genprodukte identifiziert werden, von denen etwa 30 zu den Strukturproteinen gezählt werden (Baldick & Shenk, 1996). Als Strukturproteine werden Bestandteile der viralen Partikel bezeichnet, dazu zählen die Kapsid- und Tegumentproteine, sowie die Membranglykoproteine des HCMV.

1.3.3 Viraler Infektionszyklus

Der Infektionszyklus des HCMV benötigt in Zellkultur von der Adsorption bis zur Freisetzung der Tochtervirionen einen Zeitraum von 72 h. Innerhalb dieser Zeitspanne findet die zeitlich gestaffelte Expression von sehr frühen (immediate early, IE), frühen (early, E) und von späten Genen (late, L) statt, die in Koordination mit der DNA-Replikation in der späten Phase zur Virus-Vermehrung führt.

1.3.3.1 Adsorption und Penetration: die Funktion viraler Glykoproteine

Die Anlagerung des HCMV an die Wirtszelle und die anschließende Fusion mit der Plasmamembran verläuft nach dem derzeitigen Kenntnisstand in mehreren Schritten. Als primärer unspezifischer Rezeptor für die Anheftung des HCMV („attachment“) gelten Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) der Plasmamembran der Wirtszelle (Compton *et al.*, 1992). Für diese Bindung ist vermutlich vor allem der Glykoproteinkomplex II, möglicherweise auch der Glykoproteinkomplex I verantwortlich (Kari & Gehrz, 1992; Boyle & Compton, 1998). Diese Interaktion ermöglicht den nächsten Schritt, die spezifische Bindung von viralen Glykoproteinen an zelluläre Rezeptoren. Als potentielle HCMV-Rezeptoren wurden u.a. der Haupthistokompatibilitätskomplex der Zelle (Grundy *et al.*, 1987) sowie CD 13 (Söderberg *et al.*, 1993) diskutiert. Die Hypothese, dass es sich bei der tetrameren Form des Annexin II um den zellulären Rezeptor des Glykoproteins B handelt, wurde inzwischen widerlegt (Wright *et al.*, 1994; Pietropaolo & Compton, 1999). Die eindeutige Identifizierung eines 92,5 kDa großen Proteins als möglicher zellulärer Rezeptor des Glykoproteins H steht bislang noch aus (Keay *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 2000). Im Anschluss an die Adsorption erfolgt die Penetration durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zielzelle. Der eigentliche Fusionsvorgang ist pH-unabhängig (Compton *et al.*, 1992) und noch weitestgehend unverstanden. Vor allem aus Untersuchungen an stabil transfizierten Zellkulturen wird geschlossen, dass das Glykoprotein B am Fusionsvorgang beteiligt ist (Tugizov *et al.*, 1994; Bold *et al.*, 1996).

Eine Beteiligung der Glykoproteine H und L während des Fusionsvorgangs wird diskutiert (Keay & Baldwin, 1991; Milne *et al.*, 1998).

Die so eingeschleusten nackten Nukleokapside werden vermutlich analog zum Herpes Simplex Virus 1 (HSV 1) durch Dynein vermittelten Transport entlang von Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Sodeik *et al.*, 1997). Funktionelle Strukturkomponenten des Virus, wie die Tegumentproteine pp71 (pUL82) und pUL69 leiten die virale und zelluläre Genexpression ein. Sie transaktivieren vermutlich den HCMV-IE-1/2 „Enhancer“-Promotor (Liu & Stinski, 1992; Winkler *et al.*, 1994 und 1995) und initiieren so die Transkription der IE-Gene.

1.3.3.2 Transkription, DNA-Replikation und Zusammenbau der Kapside

Nach Bindung der Kapside an den Kernporenkomplex wird die virale DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala *et al.*, 2000) und zirkularisiert. Die kaskadenartig gestaffelte Transkription und Expression der viralen Gene beginnt. Die sehr frühe Transkriptionsphase (IE; 0,5 h nach Infektion) führt zur Synthese von regulatorischen Proteinen und ist unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine. Die Transkription der IE-Gene wird durch den „major immediate early“ Promotor reguliert, einen der stärksten bekannten eukaryotischen Promotoren, und ist nach etwa 3 Stunden abgeschlossen. Die Transkription der frühen Gene (E) beginnt. In diesem Zeitraum (3-36 h nach Infektion) werden vor allem Genprodukte synthetisiert, die für die DNA-Replikation benötigt werden, wie z.B. die DNA-Polymerase. Die späte Phase (L) der Expressionskaskade umfasst den Zeitraum von 36-72 h nach Infektion und setzt mit dem Beginn der DNA-Replikation ein. Die in dieser Phase exprimierten L-Proteine gehören überwiegend zu den Strukturproteinen, den späteren Bestandteilen der reifenden Tochtervirionen.

Die Morphogenese der Tochtervirionen beginnt mit dem Zusammenbau der Kapside im Kern. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen können drei verschiedene Kapsidformen unterschieden werden, die A-, B- und C-Kapside. Die B-Kapside, die noch keine DNA enthalten, sind Vorläuferformen der A- und C-Kapside. Die ebenfalls DNA-freien A-Kapside entstehen durch Fehler bei der DNA-Verpackung, während die korrekte Verpackung von Genomeinheiten zur

Bildung reifer C-Kapside führt. Dabei wird die konkatemere virale DNA, die nach dem „Rolling circle“ Mechanismus erzeugt wird (McVoy & Adler, 1994), vermutlich unter Beteiligung des Proteins p130 (pUL56), an den α -Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und in die Kapside verpackt (Bogner *et al.*, 1998).

1.3.3.3 Transport und Reifungsknospung

Sowohl die reifen Kapside als auch die nicht infektiösen A-Kapside verlassen über einen als Transportknospung bezeichneten Prozess den Kern und gelangen ins Cytoplasma (Radsak *et al.*, 1995). Der Transport der Kapside durch die Kernmembran beginnt mit der fokalen Auflösung der nukleären Laminastrukturen. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich durch die Aktivität viraler Proteine katalysiert, die den Phosphorylierungsstatus der Lamine A und C verändern (Radsak *et al.*, 1991). Die Kapside gelangen durch diesen Knospungsprozess durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum, wobei sie möglicherweise durch die Vermittlung viraler Glykoproteine (Radsak *et al.*, 1990) von der inneren Kernmembran umhüllt werden (Abb. 3). Diese temporäre Lipidhülle fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran und setzt die nackten Nukleokapside ins Cytoplasma frei (Radsak *et al.*, 1995). Die endgültige Umhüllung der Kapside findet an Membranen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) statt (Tooze *et al.*, 1993). Für diesen Vorgang werden Membranen mit inserierten viralen Glykoproteinen von der Plasmamembran in das Kompartiment der Umhüllung reinternalisiert (Radsak *et al.*, 1996). Diese zweite Knospung, die sogenannte Reifungsknospung führt zu Kapsiden mit doppelter Lipidhülle. Die äußere dieser Hüllen fusioniert im letzten Schritt der Exocytose mit der Plasmamembran, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden (Abb. 3).

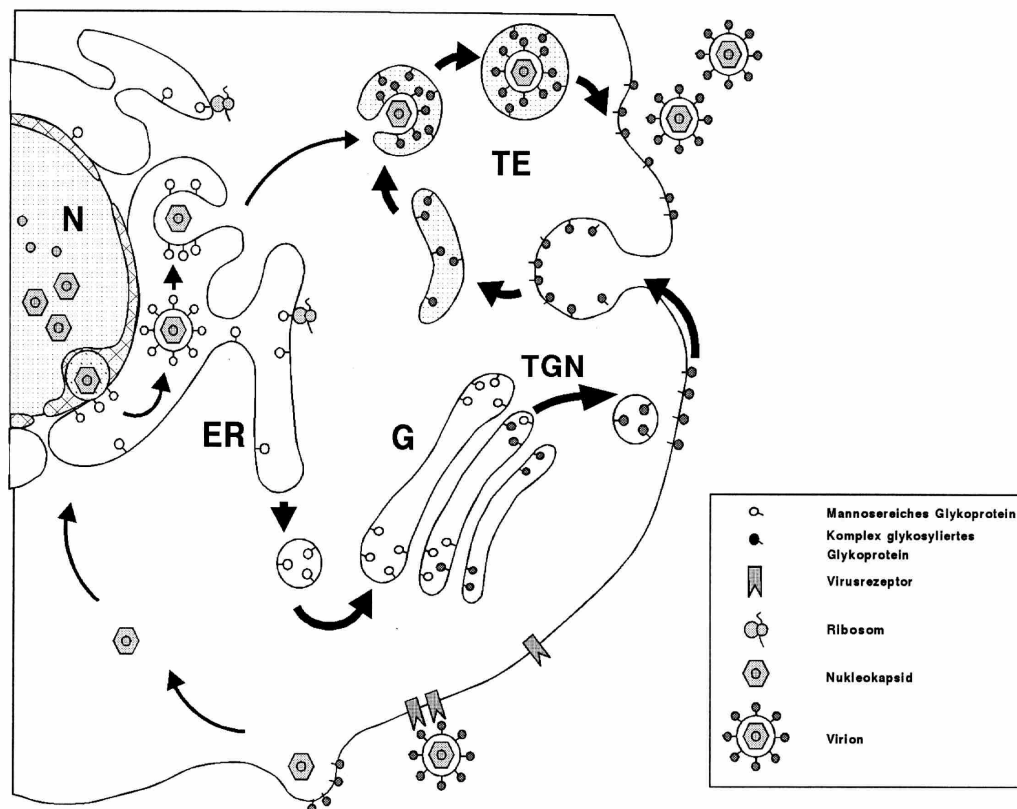


Abb. 3 Schematische Darstellung der Morphogenese des humanen Cytomegalievirus und des intrazellulären Transportes des Glykoproteins B

Die schmalen Pfeile bezeichnen den Weg der reifen Virionen, die stärkeren Pfeile bezeichnen die intrazelluläre Transportroute des gB (Radsak, *et al.*, 1990). Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, TE = tubuläres Endosom, G = Golgi, N = Zellkern, TGN = Transgolgi Netzwerk.

1.4 Herpesvirale Membranglykoproteine

Die in der viralen Hülle integrierten Membranglykoproteine der Herpesviren sind die Vermittler der viralen Infektiosität. Sie stellen den initialen Kontakt zur Wirtszelle her und leiten die Fusion von Virushüll- und Plasma-Membran ein. Darüber hinaus sind sie offenbar auch an den Vorgängen zur Transport- und Reifungsknospung während der Morphogenese und an der Ausbreitung der Viren innerhalb eines infizierten Gewebes beteiligt.

Durch ihre exponierte Lage sind sie ein Hauptziel für neutralisierende Antikörper im infizierten Wirtsorganismus. Detaillierte Vorstellungen zu den molekularen Mechanismen dieser Aktionen sind bisher nur in begrenztem Umfang für die α -Herpesviren vorhanden.

1.4.1 Homologien und Funktion

Die Nomenklatur der Glykoproteine der Herpesviren orientiert sich an der des bisher am besten untersuchten α -Herpesvirus, dem Herpes Simplex Virus. Die Glykoproteine werden mit gX abgekürzt, wobei sich die Großbuchstaben auf die Reihenfolge beziehen, in der die Proteine entdeckt wurden.

Die bisher identifizierten und z.T. hochkonservierten Glykoproteine des HSV 1 und des HCMV sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Einteilung in homologe Glykoproteine erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien auf Aminosäureebene und/oder Positionshomologien bezüglich der Anordnung der Gene innerhalb der Genome, bzw. innerhalb konservierter Genblöcke.

Tabelle 2: Homologe Glykoproteine des HSV 1 und des HCMV

HSV 1	HCMV
gB	gB (gpUL55)
gC	
gD	
gE	
gG	
gH	gH (gp UL75)
gI	
gJ	
gK	
gL	
gM	gL (gp UL115)
	gM (gp UL 100)
	gN (gp UL 73)
	gO (gp UL74)

Für das HCMV konnten bislang vier zum HSV 1 homologe Glykoproteine beschrieben werden. Ob sich aus den Homologien Analogien hinsichtlich der biologischen Funktionen der Glykoproteine ableiten lassen ist fraglich, da zwischen den homologen Proteinen durchaus strukturelle Unterschiede bestehen, die sowohl die Primärsequenz, als auch posttranslationale Modifikationen betreffen. So können z.B. die gB Homologen von α -Herpesviren nicht durch die von β -Herpesviren komplementiert werden (Lee *et al.*, 1997).

1.4.2 Membranglykoproteine des Humanen Cytomegalievirus

Die viralen Glykoproteine des HCMV sind in Form hochmolekularer Komplexe auf der Virusoberfläche organisiert. Bislang konnten drei Glykoproteinkomplexe (gcl-III) beschrieben werden.

Der gcl besteht aus Homodimeren des Glykoproteins B, welche über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Eickmann *et al.*, 1998). Nach neusten Erkenntnissen ist auch eine Tetramerisierung des gB vorstellbar (Scheffczik *et al.*, 2001).

Der gclI besteht aus den Glykoproteinen M (gp UL100) und N (gp UL73), die ebenfalls kovalent miteinander verknüpft sind (Kari & Gehrz, 1993; Mach *et al.*, 2000). Der heterotrimere gclIII setzt sich aus den Glykoproteinen H (gp UL75), L (gp UL115) und O (gp UL74) zusammen (Cranage *et al.*, 1988; Kaye *et al.*, 1992; Huber & Compton, 1998; Huber & Compton, 1999).

1.4.2.1 Das Glykoprotein B (gcl)

Das Glykoprotein B ist das abundante Membranglykoprotein und kann bis zu 50% des Gesamtproteingehalts der Virushülle ausmachen (Britt & Mach, 1996). In der infizierten Zelle kann es in der inneren Kernmembran, in ER- und Golgi-Membranen, in Zisternen des Tubulären Endosoms, sowie in der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden.

Im infizierten Organismus induziert es die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Britt *et al.*, 1990; Gonczol *et al.*, 1991; Marschall *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Eigenschaften wird dem gB eine essentielle Funktion bei der Virus-Adsorption und Fusion zugeschrieben.

1.4.2.1.1 Struktur, Reifung und Transport des Glykoproteins B

Der offene Leserahmen UL55 des HCMV Stamms AD169 ist 2718 bp lang und kodiert für ein aus 906 Aminosäuren bestehendes Protein.

Das gB gehört zu den Typ I-Transmembranproteinen, d.h. der Carboxyterminus ist cytoplasmatisch lokalisiert, der Aminoterminus befindet sich dagegen im Lumen des jeweiligen Zellkompartiments (Basgoz *et al.*, 1992). Es verfügt über ein N-terminal gelegenes 24 AS langes Signalpeptid, welches die cotranslationale Translokation durch die ER-Membran bedingt und besitzt darüber hinaus zwei hydrophobe Domänen (hd1 und hd2) von denen die hd2 zwischen AS 752 und 771 der Membranverankerung dient (Reschke *et al.*, 1995). Das am RER als etwa 100 kDa großes Vorläuferprotein synthetisierte gB-Molekül wird cotranslational oligomerisiert (Britt & Vulger, 1992; Eickmann *et al.*, 1998) und zu einer mannosereichen Form glykosyliert. Während der Passage durch den Golgi-Apparat kommt es zu weiteren Modifikationen, die vor allem die komplexe Glykosylierung betreffen. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) wird das Molekül durch die zelluläre Endoprotease Furin an AS-Position 459/460 proteolytisch prozessiert (Vey *et al.*, 1995), wodurch ein N-terminales (gB^N) und ein C-terminales Spaltfragment (gB^C) entsteht. Das 90 kDa große gB^N und das 55 kDa große gB^C, welches membranverankert ist, bleiben dabei über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Farrar & Greenaway, 1986; Britt & Vulger, 1992). Vom TGN wird das Molekül entlang des anterograden Transportweges zur Zelloberfläche transportiert und von dort in Vesikel des tubulären Endosoms reinternalisiert (Radsak *et al.*, 1996).

1.4.2.1.2 Antigene Domänen des Glykoprotein B

Das gB weist mehrere antigene Domänen (AD) auf, von denen drei näher charakterisiert wurden (Abb. 4).

Die antigene Domäne 1 (AD1) liegt im Bereich der AS 552-635, die AD2 umfasst die AS 50-86, die AD3 die AS 783-906. Neben diesen linearen Epitopen wurden auch konformationsabhängige Epitope des gB beschrieben (Lussenhop *et al.*, 1988, Kari & Gehrz, 1991, Quadri *et al.*, 1992). Die AD1 ist die dominante Antikörper-Bindungsstelle des gB (Schoppel *et al.*, 1997) und mit einer Länge von 75 AS kein konventionelles lineares Epitop. Für die Antikörperbindung ist vermutlich die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an AS Position 573 und 610 der AD1 essentiell (Eickmann *et al.*, 1998; Speckner *et al.*, 2000). Dieser antigene, disulfidverbundene „Loop“ bleibt offenbar auch nach Oligomerisierung des gB erhalten und wird von neutralisierenden Human-Antikörpern erkannt (Speckner *et al.*, 2000). Vermutlich beinhaltet die AD1 mehrere Antikörperbindungsstellen (Schoppel *et al.*, 1996), da in polyklonalen Anti-HCMV-gB Seren eine Vielzahl unterschiedlichster AD1-spezifischer Antikörper, darunter auch nicht-neutralisierende Antikörper, nachgewiesen werden können (Speckner *et al.*, 1999).

Die AD2 besteht aus zwei Epitopen, dem Epitop 1 von AS 50-54, welches HCMV stammspezifisch ist und dem linearen Epitop 2 von AS 67-86.

Sowohl die AD1 als auch das 2. Epitop der AD2 induzieren im infizierten Organismus die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Meyer *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992; Kniess *et al.*, 1991). Nahezu 100% der infizierten Personen mit Anti-gB-Antikörpern besitzen AD1-spezifische AK, während das AD2-Epitop von etwa 47% der Serumproben HCMV-positiver Personen erkannt wird (Schoppel *et al.*, 1997).

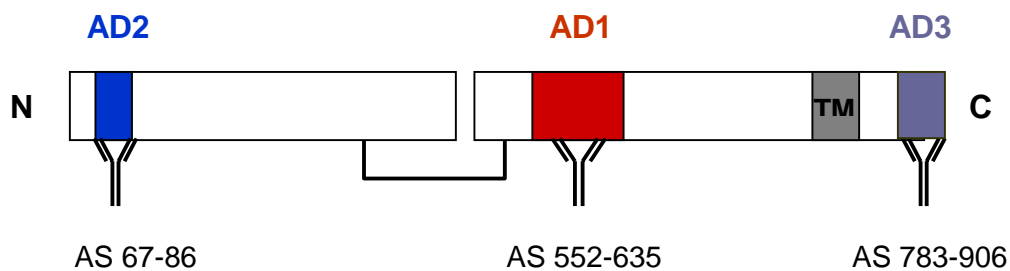


Abb. 4 Schematische Darstellung des gB mit Antikörperbindungsstellen

Dargestellt ist das gespaltene gB-Molekül aus N-terminalem und C-terminalem Spaltfragment. Die antigenen Domänen AD1, AD2 und AD3 sind hervorgehoben und ihre AS-Positionen sind gekennzeichnet.

1.4.2.2 Die Glykoproteine H, L und O (gc III)

Das Glykoprotein H wird durch den offenen Leserahmen UL75 (2229 bp) des HCMV-Stamms AD169 kodiert. Bei dem 734 AS langen Protein handelt es sich um ein Typ I Membranglykoprotein mit einer sehr kurzen cytoplasmatischen Domäne von nur 6 AS, während es sich bei den Glykoproteinen L (UL115, 306 AS) und O (UL74, 466 AS) vermutlich um nicht membranverankerte Glykoproteine handelt (Huber & Compton 1999; Theiler & Compton, 2001). Die Entstehung des hochmolekularen Komplexes gc III erfolgt initial durch die Bildung von gH-gL Heterodimeren im ER. Die anschließende Interaktion des gO mit dem gH-gL-Komplex, über dessen Charakter bislang nichts bekannt ist, findet vermutlich ebenfalls im ER statt (Huber & Compton, 1999). Weitere Modifikationen finden im post ER-Kompartiment statt, bevor der 240 kDa große Komplex zur Plasmamembran transportiert wird.

In transienten Coexpressions-Studien konnte gezeigt werden, dass für die korrekte Prozessierung und den Oberflächentransport des gH die Assoziation mit dem gL sowohl notwendig als auch hinreichend ist (Kaye *et al.*, 1992; Spaete *et al.*, 1993). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der Virus-Morphogenese neben den „trimeren“ gcIII Komplexen auch Heterodimere aus gH und gL gebildet werden. Die Funktionen des gcIII Komplexes sind bislang noch nicht näher untersucht.

Aufgrund von Untersuchungen an gH und gL Homologen anderer Herpesviren wird eine Beteiligung der Glykoproteine H/L bzw. des gclII Komplexes an der HCMV-vermittelten Fusion und Zell-Zell-Ausbreitung angenommen (Anderson & Gompels, 1999). Für die Beteiligung am Fusionsvorgang sprechen u.a. auch Fusions-Inhibierungsstudien mittels Anti-Idiotyp-spezifischer Antikörper (Keay & Baldwin, 1991) und die Tatsache, dass das Glykoprotein H im infizierten Organismus die Bildung neutralisierender Antikörper gegen lineare und konformationsabhängige Epitope induziert (Reschke, 1990; Bogner *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 1993).

1.4.2.3 Die Glykoproteine M und N (gclI)

Der offene Leserahmen UL100 des HCMV Stamms AD169 kodiert für ein aus 372 AS bestehendes integrales Membranprotein, das Glykoprotein M. Das 138 AS lange Glykoprotein N wird durch den offenen Leserahmen UL73 kodiert. Die gM-homologen Proteine der Herpesviren sind Typ III Membranglykoproteine mit sechs bis acht Transmembrandurchgängen und kommen in allen Membranen der infizierten Zelle, sowie in der Virushülle vor (Baines & Roizman, 1993; Dijkstra *et al.*, 1996; Osterrieder *et al.*, 1997). Bei den gN-Homologen handelt es sich um sehr kleine Typ I Membranproteine mit einem Molekulargewicht von unter 7 bis 20 kDa (Jons *et al.*, 1996; Lake *et al.*, 1998).

Im Falle von HCMV ist die Komplexbildung der Glykoproteine M und N vermutlich für den Transport der Proteine vom ER zum Golgi und trans-Golgi-Kompartimenten essentiell. Der Komplex wird sowohl über Disulfidbrücken als auch nicht-kovalente Bindungen stabilisiert und kann in der viralen Hüllmembran des HCMV nachgewiesen werden (Mach *et al.*, 2000). Die Funktionen des gclI Komplexes wurden bislang nicht näher charakterisiert, jedoch lässt die Fähigkeit des gclI Komplexes Heparin zu binden auf eine Beteiligung an der Virus-Adsorption schließen (Kari & Gehrz, 1992). Auch der immunogene Charakter dieses Komplexes lässt vermuten, dass der gclI Komplex an den initialen Virus-Wirtszell-Interaktionen beteiligt ist.

1.5 Fusogene virale Glykoproteine

Die Infektion einer Zelle durch ein Virus verläuft in mehreren Schritten. Die Bindung des Virus an der Zelloberfläche, die als Adsorption bezeichnet und durch virale Liganden vermittelt wird, ist die Grundvoraussetzung für das anschließende Durchdringen (Penetration) der Zellmembran. Hinsichtlich der Aufnahme umhüllter Viren sind zwei unterschiedliche Prozesse bekannt. Entweder wird das an die Zellmembran gebundene Virus durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen, der sich in einem pH-abhängigen Prozess die Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran anschließt (z.B. Influenza); oder spezifische Virus-Zell-Interaktionen ermöglichen die direkte, pH-unabhängige Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran (z.B. Herpesviren, HIV). Beide Mechanismen werden durch virale, fusogene membranverankerte Glykoproteine der Virushülle katalysiert.

1.5.1 Herpesvirale Adsorption und Fusion

Die herpesvirale Adsorption ist ein komplexer Vorgang und wird vermutlich durch die Bindung viraler Glykoproteine an Heparansulfat-Proteoglykanen der Plasmamembran der Wirtszelle eingeleitet („attachment“; WuDunn & Spear, 1989). Ob ein Glykoprotein an der Virus-Adsorption und Fusion beteiligt ist oder nicht, kann mit Hilfe viraler Glykoprotein-Deletionsmutanten überprüft werden. Die Deletion eines essentiellen Glykoproteins führt jedoch zu nicht vermehrungsfähigen Viren, so dass virale Deletionsmutanten zur Anreicherung phänotypisch komplementiert werden müssen. Im Gegensatz zu Herpesviren anderer Subfamilien steht für das HCMV bislang kein Zellsystem zur Verfügung um essentielle Glykoproteine phänotypisch zu komplementieren (Strive, 2000). Für das Herpes Simplex Virus 1 konnte anhand von Glykoprotein-Deletionsmutanten den fünf viralen Glykoproteinen gB, gC, gD, gH und gL Funktionen bei der Virus-Adsorption und Fusion zugeschrieben werden (Spear, 1993). Vier dieser Glykoproteine, gB, gD, gH und gL, sind essentiell für die Virusinfektion. Nach dem derzeitigen Kenntnis-

stand wird die Virus-Adsorption durch die Glykoproteine C und B vermittelt, die an Heparansulfat-Proteoglykanen der Plasmamembran binden (Herold *et al.*, 1994). Die molekulare Interaktion der Heparinbindungsproteine mit ihren Liganden wird kontrovers diskutiert, basiert vermutlich aber auf einer Interaktion von positiv geladenen Aminosäureresten mit negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen der Heparansulfat-Moleküle (Lycke *et al.*, 1991; Shieh *et al.*, 1992). Während für das gC und gB des HSV-1 bereits definierte Heparansulfatbindungsstellen identifiziert werden konnten (Trybala *et al.*, 1994; Laquerre *et al.*, 1998; Mardberg *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001), liegen für die entsprechenden Heparansulfat-Bindungsproteine des HCMV, den gCII Komplex und das gB, bislang keine vergleichbaren Daten vor. Die HSPG-Bindung erleichtert vermutlich die anschließende spezifische Bindung an zelluläre Rezeptorproteine, die im Falle des HSV-1 durch das gD vermittelt wird. Für das gD des HSV-1 konnten verschiedene Rezeptoren beschrieben werden, die in drei Klassen eingeteilt werden (Spear *et al.*, 2000). Das HveA (herpesvirus entry mediator) gehört zur Tumor Nekrosis Faktor (TNF) Rezeptor-Familie. Die zweite Rezeptorenklasse, die HveC und HveB (Nectin-1 und -2) beinhaltet, gehört zur Immunglobulin Superfamilie, während der dritten Rezeptorenklasse modifizierte Heparansulfat-Derivate (3-O-S Heparansulfat) angehören.

Die Bindung des gD an einen der o.g. Rezeptoren führt vermutlich zur Einleitung der Membranfusion, an der sowohl gB-Oligomere und gH/gL-Heterodimere als auch gD und dessen Rezeptor beteiligt sind. Die direkte Beteiligung der Glykoproteine B, D, H und L an der Membranfusion wird durch Untersuchungen an transient exprimierten Glykoproteinen gestützt. Mittels verschiedener Fusions-Assays konnte gezeigt werden, dass die Coexpression von gB, gD, gH und gL sowohl notwendig als auch hinreichend zur Induktion der Zell-Zell-Fusion ist (Turner *et al.*, 1998; Muggeridge 2000). Es wird angenommen, dass sich die viralen und zellulären Determinanten der glykoproteininduzierten Zell-Zell-Fusion von denen der virusinduzierten Adsorption und Fusion in einem Punkt unterscheiden. Für die Zell-Zell-Fusion ist die Existenz des entsprechenden gD-Rezeptors auf der Zielzelle absolut erforderlich, nicht jedoch die Bindung über HSPGs. Im Gegensatz dazu scheint die HSPG-Bindung die Adsorption des Virus entscheidend zu beeinflussen (Pertel *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 2001).

Für das HCMV konnte bislang kein entsprechender transienter Zell-Zell-Fusions-Assay etabliert werden.

Der der Membranfusion zugrunde liegender Mechanismus ist noch weitestgehend unverstanden und unterscheidet sich vermutlich von den bisher bekannten Membranfusionsmodellen bei anderen Viren, wie dem des Influenza oder des Humanen Immundefizienz Virus (HIV).

1.5.2 Fusionsmechanismen

Klassische Fusionsproteine, wie z. B. das Influenza-Hämagglutinin oder das HIV gp120-gp41 besitzen neben der hydrophoben Transmembrandomäne eine weitere hydrophobe Domäne, das Fusionspeptid. Das Fusionspeptid, das nach proteolytischer Spaltung des Vorläufermoleküls im N-terminalen Bereich des membranverankerten Spaltfragments entsteht, ist im nativen Zustand inaktiv und wird im Falle von Influenza erst durch die pH-Wert-Senkung im Endosom aktiviert. Dabei kommt es zu einer irreversiblen Konformationsänderung des Proteins, so dass das Fusionspeptid in Richtung der Zellmembran verschoben und eine Interaktion mit der Membran der Zielzelle ermöglicht wird. Dabei kommt es zunächst zur Vermischung der sich zugewandten Phospholipidschichten (Hemifusion; Kemble *et al.*, 1994), bevor die beiden Laminae der beiden Doppelmembranen miteinander verschmelzen (Fusionspore; White, 1990) (Abb. 5).

Die Aktivierung des Fusionspeptids des HIV erfolgt pH-unabhängig. Der fusogene Glykoproteinkomplex des HIV besteht aus trimeren nicht-kovalent assoziierten Glykoprotein-Untereinheiten, dem gp120 und dem membranverankerten gp41 (Moore *et al.*, 1993). Die Rezeptorbindung an CD4 wird durch gp120 vermittelt und führt zu Konformationsänderungen des gp120, so dass eine Corezeptor-Bindungsstelle für die zellulären Rezeptoren CCR5 oder CXCR4 exponiert wird (Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998; Wyatt & Sodroski, 1998). Diese Corezeptorbindung führt ihrerseits zu weiteren Konformationsänderungen im gp120-gp41-Komplex und somit zur Insertion des im membranverankerten gp41 gelegenen Fusionspeptids in die Plasmamembran (Chan *et al.*, 1997; Weisenhorn *et al.*, 1997).

Herpesvirale Glykoproteine besitzen hingegen keine klassischen terminalen Fusionspeptide, sondern allenfalls „interne“ Fusionspeptide, deren Funktion bisher weitestgehend unverstanden ist.

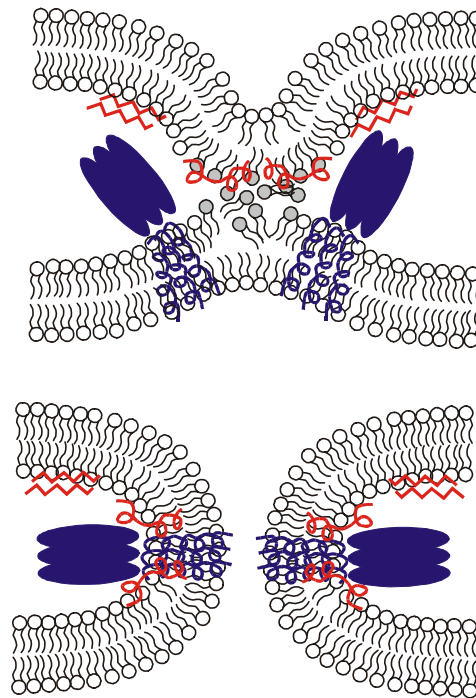


Abb. 5 Schematische Darstellung der Fusionspeptid-vermittelten Membranfusion (nach Tamm, L.K. & Han, X., 2000)

Die Transmembranregionen der Fusionsproteine, die in der viralen Membran inseriert sind, sind als trimere Bündel dargestellt. Die Ektodomänen sind in Form globulärer Trimere, die Fusionspeptide sowohl in monomerer α -helikaler- als auch in β -Faltblatt-Struktur dargestellt.

(A) Hemifusion: die Insertion des Fusionspeptids (amphipathische α -Helix) führt zur partiellen Lipidvermischung.

(B) Fusionspore: die Initiierung der Fusionspore erfolgt vermutlich durch die Interaktion von Fusionspeptid und Transmembranankerregion des Proteins.

2 Problemstellung

Die Membranglykoproteine des humanen Cytomegalievirus sind die Vermittler der viralen Infektiösität. Sie sind für die Kontaktaufnahme zwischen Virus und Wirtszellmembran verantwortlich und leiten die Fusion von Virushülle und Plasmamembran ein. Der Fusionsvorgang selbst ist pH-unabhängig und ermöglicht die Penetration des viralen Partikels in die Wirtszelle.

Die Untersuchung der initialen Virus-Wirtszell-Interaktion, speziell die Untersuchung der viralen Fusionsaktivität setzt das Vorhandensein eines geeigneten und empfindlichen Meßsystems voraus. Bisherige Tests zur Untersuchung von herpesviral-vermittelten Fusionsvorgängen beruhen auf der lichtmikroskopischen Auszählung von mehrkernigen Zellen, die das Ergebnis einer Virus-induzierten Zell-Zell-Fusion darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Fusions-Assay für das HCMV-System zu etablieren, mit dem zuverlässig und reproduzierbar die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion anhand eines geeigneten Reporters detektiert werden kann.

Des weiteren sollte mit Hilfe des Fusions-Assays in einem transienten Transfektionsansatz, überprüft werden, ob die solitär exprimierten Glykoproteine B oder H und L des HCMV, für eine Zell-Zell-Fusion hinreichend sind. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welche möglichen Glykoprotein-Kombinationen für eine effiziente Zell-Zell-Fusion notwendig sind.

Zudem sollten Domänen des immundominanten Glykoproteins B, die an der initialen Virus-Wirtszell-Interaktion und/oder Fusion beteiligt sind, identifiziert werden und somit ein Beitrag zum besseren Verständnis der HCMV-vermittelten Adsorption und Fusion geleistet werden.

3 Material

3.1 Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Bio Imager BAS 1000	FujiFilm, Kangawa, Japan
Digitale Kameraausrüstung Spot	Diagnostic Instruments Michigan, USA
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Labovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Minigelkammer, horizontal	Biorad, München
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Photospektrometer DU40	Beckmann, Glenrothes, USA
Ultraschallgerät Sonifer® B15	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L7-55/L8-55M	Beckmann, Frankfurt
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, Frankfurt
Zentrifuge J2-21	Beckmann, Frankfurt
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

3.2 Verbrauchsmaterialien

Halbmicro-Küvetten	Brand, Wertheim
Nitrozellulose-Membran, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
HPTLC-Kieselgel 60 Platten	Merck, Darmstadt
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA
Röntgenfilme BioMax	Eastman Kodak, New York, USA

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA Perkin Elmer, Norwalk, USA
Spritzen/Kanülen	Greiner, Nürtingen Braun, Melsungen
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen/-schalen	Greiner, Nürtingen Costar, Cambridge, USA
Zellschaber	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Acetyl-Coenzym A	Boehringer, Mannheim
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin (Trasylol)	Bayer, Leverkusen
2-Amino-2-(hydromethyl)-propan- 1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D- galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylacetat	Merck, Darmstadt

Glycerin	Merck, Darmstadt
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natrium-Heparin	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
reduziertes Glutathion	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Alle nicht näher beschriebenen Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

BioRad	München
Life Technologies	Eggenstein
Merck	Darmstadt
Pierce	Rockford, USA
Riedel-de Haen	Seelze
Roche Molecular Biochemicals	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sigma	Deisenhofen
Serva	Heidelberg

3.4 Antibiotika

Ampicillin	Merck, Darmstadt
Penicillin	Life Technologies, Karlsruhe
Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Geneticin	Life Technologies, Karlsruhe

3.5 Kulturmediengrundstoffe

Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Hefeextrakt granuliert	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich
L-Glutamin 200mm (100x)	Life Technologies, Karlsruhe
OPTIMEM I	Life Technologies, Karlsruhe

3.6 Enzyme

AmpliTaq [®] DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
DNase I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RibonukleaseA (RNaseA)	Serva, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Thermus thermophilus-Polymerase Mix (Tth-Polymerase Mix)	Clontech, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Karlsruhe

3.7 Radioaktive Verbindungen

Redivue Pro-mix L-[³⁵ S] in vitro cell labelling mix spez. Aktivität 37 TBq/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
D-threo-[dichloroacethyl-1- ¹⁴ C]- Chloramphenicol spez. Aktivität 1,85-2,29 GBq/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.8 Antikörper

Peroxidase-konjugiertes Anti-Human IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Peroxidase- konjugiertes Anti-Maus IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Fluorescein-konjugierte Anti-Maus-IgG, F(ab')-Fragmente von der Ziege	Dianova, Hamburg
Fluorescein-konjugierte Anti-Human-IgG, F(ab')-Fragmente von der Ziege	Dianova, Hamburg
Alexa Fluor™ 488 Anti-Maus-IgG von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Alexa Fluor™ 594 Anti-Maus-IgG von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Anti-GST-Antikörper von der Ziege	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-His-Antikörper von der Maus	Dianova, Hamburg
Anti-VSV-G-Antikörper von der Maus	Sigma, Deisenhofen

Monoklonale Anti-HCMV-Antikörper

Anti-AD 1-gB von der Maus mab 27-156	W. Britt, Universität Alabama, Birmingham, USA
Anti-AD 3-gB von der Maus mab 58-15-18	W. Britt, Universität Alabama, Birmingham, USA
Anti-AD 2-gB vom Menschen ITC 88	M. Ohlin, Universität Lund, Schweden
Anti-AD 1-gB vom Menschen ITC33, 39, 48, 52, 63B	M. Ohlin, Universität Lund, Schweden
Anti-pp65 vom Menschen Mo58	M. Ohlin, Universität Lund, Schweden
Anti-IE-IgG von der Maus	VIVA diagnostica, Köln

Polyklonale Anti-HCMV-Antikörper

Anti-gH-IgG vom Menschen	Elke Reis und Stephan Rinn, Inst. für Virologie, Marburg
--------------------------	---

Polyklonales, polyspezifische
Anti-HCMV-Serum

Inst. für Virologie, Marburg

3.9 Kits

ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing
Ready Reaction Kit

Applied Biosystems, Weiterstadt

Lipofectin[®] Reagent

Life Technologies, Karlsruhe

QIAfilter Plasmid Maxi Kit

Qiagen, Hilden

QIAamp DNA Mini Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

QIAprep Spin Plasmid Kit

Qiagen, Hilden

SuperSignal[®] West Dura Extended
Duration Substrate

Pierce, Rockford, USA

3.10 Medien

Luria-Bertani Broth (LB) Medium

Bacto-Trypton 5,0 g/l

Bacto-Hefeextrakt 10,0 g/l

NaCl 10,0 g/l

MgSO₄ (7H₂O) 2,5 g/l

aqua bidest

LB-Agar

Bacto-Trypton 5,0 g/l

Bacto-Hefeextrakt 10,0 g/l

NaCl 10,0 g/l

MgSO₄ (7H₂O) 2,5 g/l

Bacto-Agar 15,0 g/l

aqua bidest

LB-Medium^{Amp} /LB-Agar^{Amp}

Ampicillin	0,1 mg/l
LB-Medium/ LB-Agar	

DMEM Kulturmedium

Dulbecco's MEM (1x)	500,0 ml
L- Glutamin, 200mM (100x)	5,0 ml
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml, 5,0 mg/ml)	5,0 ml
Foetales Kälberserum	50,0 ml

3.11 Puffer*PBS-Puffer (pH 7,4)*

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	19,0 mM
KH ₂ PO ₄	2,2 mM
NaCl	0,2 mM

*aqua bidest**PBS⁺⁺-Puffer (pH 7,4)*

CaCl ₂	100,0 mM
MgCl ₂	100,0 mM
PBS-Puffer	

TAE-Puffer (50x)

Tris	2000,00 mM
EDTA (pH 8,0)	50,00 mM
Eisessig	5,71 % (v/v)

aqua bidest

3.12 Zellkultur und Virusstämme

3.12.1 Primäre humane Hautfibroblasten

OP-Präparate humaner Vorhäute wurden aus der Praxis von Dr. A. v. Keitz, Marburg erhalten und in Kultur gebracht. Für die nachfolgenden Experimente wurden Fibroblasten der 5. bis 20. Passage verwendet.

3.12.2 Astrocytoma-Zellen (U373)

Die Zelllinie U373 MG, HTB 17, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA wurde freundlicherweise von G. Jahn, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

3.12.3 Cos7-Zellen

Die Affennierenzelllinie Cos7, die durch Transformation von CV-1 Zellen mit dem SV40-T-Antigen gewonnen wurde, wurde von der American Type Culture Collection bezogen: ATCC CRL 1651

3.12.4 Virusstämme

Laborstamm AD 169 (Gupta *et al.*, 1977)

3.13 Bakterienstämme

3.13.1 *E.coli* XL1-Blue

SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 (Bullock *et al.*, 1987)
lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn 10(tet^r)]

3.13.2 *E.coli* BL21

B⁻ F⁻ *ompT hsdS* (r_B⁻, m_B⁻)

(Studier & Moffatt, 1986)

3.13.3 *E.coli* JM 109

recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) *relA1*
supE44 Δ (*lac-proAB*)

(Yanisch-Perron *et al.*,
1985)

[F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]

3.13.4 *E.coli* SSC110

rpsL (Str^r) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara*
tonA tsx dam dcm supE44Δ (*lac-proAB*)

(laut Herstellerangaben:
Statagene, La Jolla, USA)

[F' *traD36 proAB lacI^qZΔM15*]

3.14 Plasmide und Vektoren

3.14.1 Der Reporter-gen-Vektor pG5CAT

Der Vektor pG5CAT (Abb. 6), der ursprünglich zur *in vivo* Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Säugetierzellen („Mammalian Two-Hybrid“) verwendet wird, wurde von der Firma Clontech, Heidelberg bezogen. Der 4,5 kb große Vektor verfügt über einen pUC „origin of replication“ (ori) zur autonomen Replikation in *E.coli* und über das β-Laktamase Gen (Amp^r), das eine Selektion von prokaryotischen Transformanten erlaubt. Das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) dient als Reporter-gen, dem fünf Consensus GAL4-Bindungsstellen („upstream activation signal for galactosidase“: UAS_{G 17-mer(x5)}) und der adenovirale Minimalpromotor E1b vorgeschaltet sind. Die Initiation der Transkription des CAT-Gens kann nur nach Aktivierung der GAL4-Bindungsstellen durch einen geeigneten Transaktivator erfolgen. Der Vektor wurde für transiente Transfektionen und zur Herstellung einer stabilen Reporter-gen-Zelllinie eingesetzt.

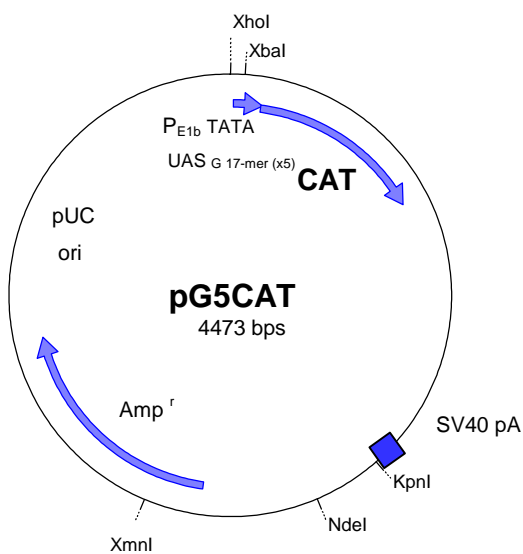


Abb. 6 Schematische Darstellung des Reporter-gen-Vektors pG5CAT

Dargestellt ist der pUC Anteil, der den pUC ori und das β -Laktamase Gen (Amp^r) beinhaltet, das CAT-Gen (CAT), die Polyadenylierungsstelle (SV40 pA), sowie der E1b Minimalpromotor (P_{E1b} TATA) und die GAL4-Bindungsstellen (UAS_{17-mer} (x5)).

3.14.2 Der Vektor pM3-VP16

Der Vektor pM3-VP16 (Abb. 7) wird als Kontrollvektor bei Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen in Säugetierzellen eingesetzt und wurde von der Firma Clontech, Heidelberg bezogen.

Die Vermehrung des 4,4 kb großen Vektors in *E. coli* wird über den pUC ori gewährleistet. Transformierte Bakterien können über das β -Laktamase Gen (Amp^r) selektioniert werden. Dem Gen der GAL4-DNA-Bindungsdomäne ist die GAL4-nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) (Silver *et al.*, 1984) vorgeschaltet. Über Restriktion mittels EcoRI und Hind III wurde das Gen der Aktivierungsdomäne des HSV-1 Proteins VP16 (VP16AD) unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters in die Polylinker-Region des Vektors pM (Clontech, Heidelberg) kloniert. Die Transkription wird durch den Simian-Virus (SV40) early Promotor (P_{SV40}) kontrolliert und das Transkript anschließend polyadenyliert (SV40 pA). Der Vektor wurde für transiente Transfektionen und zur Herstellung einer stabilen Transaktivator- Zelllinie eingesetzt.

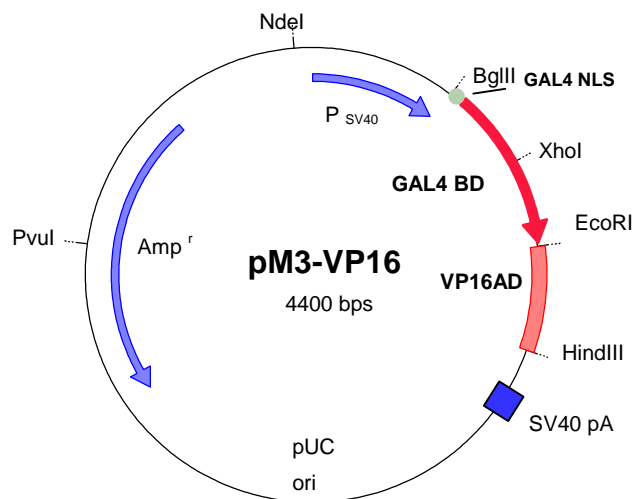


Abb. 7 Schematische Darstellung des Vektors pM3-VP16

Dargestellt ist der pUC Anteil, der den pUC ori und das β -Laktamase Gen beinhaltet, die Gene der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4 BD) und der VP16-Aktivierungsdomäne (VP16 AD), sowie der SV40 early Promotor (P_{SV40}) und die Polyadenylierungsstelle (SV40 pA).

3.14.3 Der Vektor pGEX-6P-1

Der Vektor pGEX-6P-1 (Abb. 8) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen. Dieser 4,9 kb große prokaryotische Expressionsvektor ermöglicht die Amplifizierung von Fremd-DNA-Fragmenten und deren cytoplasmatische Expression als Fusionsprotein. Stromaufwärts der Polylinker-Region, in die die Fremd-DNA kloniert werden kann, befindet sich das Gen für die Glutathion S-Transferase (GST) (Smith & Johnson, 1988) aus *Schistosoma japonicum*, gefolgt von einer PreScissionTM Protease Erkennungssequenz. Das *lacI^q*-Gen kodiert für den *lac* Repressor, der durch chemische Induktion mit IPTG inaktiviert werden kann. Durch den starken P_{tac}-Promotor, der der negativen Regulation des *lac* Repressors untersteht, kann die Transkription reguliert werden. Ferner verfügt der Vektor über ein β -Laktamase Gen (Amp^r) zur Ampicillin-Selektion transformierter Bakterien. Der Vektor wurde zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen verwendet.

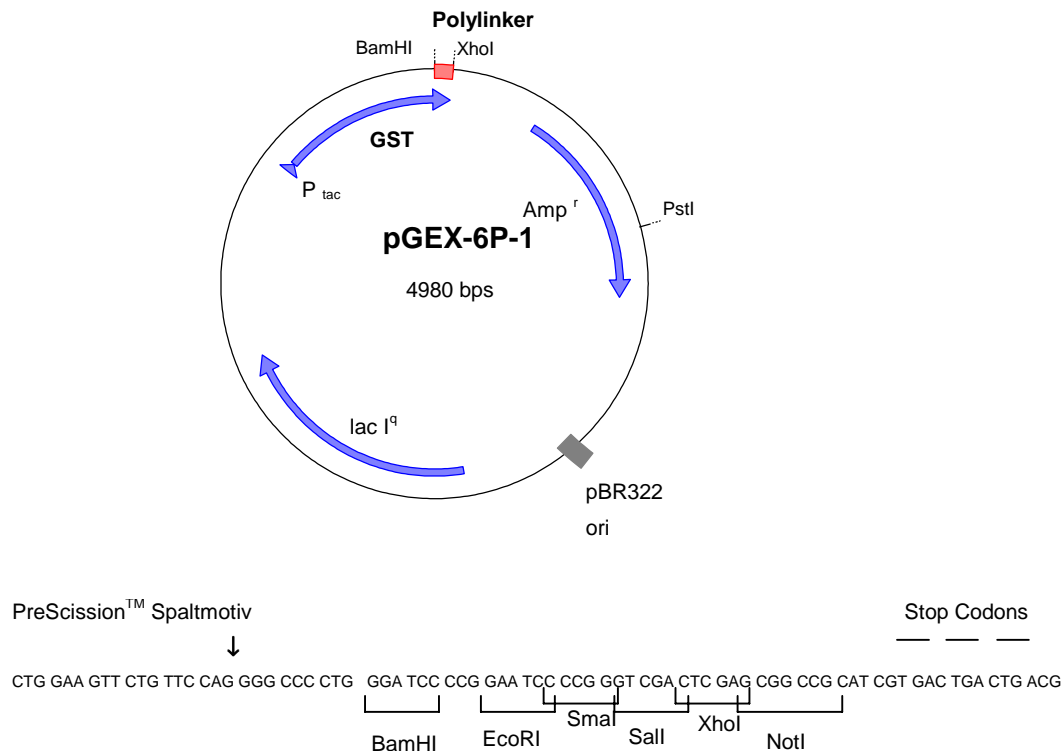


Abb. 8 Schematische Darstellung des prokaryotischen Expressionsvektors pGEX-6P-1

Dargestellt ist der pBR322 ori und das β -Laktamase Gen (Amp^r), sowie der P_{tac} -Promotor, das GST-Gen und das $lacI^q$ -Gen des Vektors. Die Polylinkerregion mit PreScission™ Spaltmotiv und Stop Codons ist vergrößert dargestellt. Der Pfeil markiert die PreScission™ Protease Spaltstelle.

3.14.4 Das eukaryotische Expressionskonstrukt pRc/CMV-gB

Das Konstrukt pRc/CMV-gB (Abb. 9) entstand durch die XmaIII-Subklonierung eines 3,2 kb-Fragments, welches das HCMV-gB-Gen (gpUL55) enthält, aus dem Vektorkonstrukt pUC 18-gB in die NotI-Schnittstelle der Polylinkerregion des Vektors pRc/CMV (Invitrogen, Heidelberg) (Reis *et al.*, 1993).

Aufgrund seiner Shuttle-Vektor-Eigenschaften lässt sich der 5,5 kb große Vektor in *E.coli* mittels des Col E1-ori vermehren und die inserierte Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen exprimieren. Prokaryotische Transformanten können aufgrund des β -Laktamase Gens (Amp^r), eukaryotische Transformanten aufgrund einer Neomycin-Resistenz (Neo^r , Aminoglykosid-Phosphotransferase-3'-Gen) selektioniert werden. In die Polylinkerregion inserierte Fremd-DNA steht unter Kontrolle des HCMV „major immediate early“-Promotors/Enhancers (P_{CMV}). Das Primärtranskript wird polyadenyliert (BGH pA, „bovine growth hormone“ poly A).

Das Konstrukt wurde für die transiente Transfektion in Cos7- und U373-Zellen verwendet.

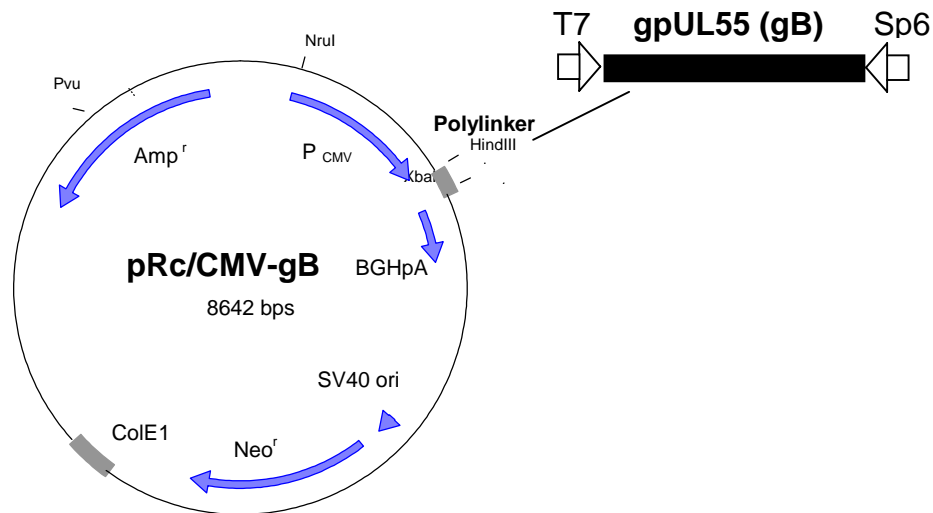


Abb. 9 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionskonstrukts pRc/CMV-gB mit inseriertem gpUL55 (gB)- Anteil (Abkürzungen siehe Text)

3.14.5 Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 myc/his

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 myc/his (Abb. 10) wurde von der Firma Invitrogen, Heidelberg bezogen. Es handelt sich um ein Derivat des eukaryotischen Expressionsvektors pRc/CMV (s. 3.14.4). Stromabwärts der Polylinkerregion befinden sich ein myc-Epitop und ein aus 6 Histidinen (6xHis) bestehendes His-Epitop, die nach Insertion von Fremd-DNA unter Erhalt des korrekten Leserasters der Epitope und anschließender eukaryotischer Expression zu Fusionsproteinen mit C-terminalem „tag“ führen. Die Fusionsproteine können sowohl mit einem myc-spezifischen, als auch mit einem 6xHis-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Der Vektor wurde zur eukaryotischen Expression in Cos7- und U373-Zellen eingesetzt.

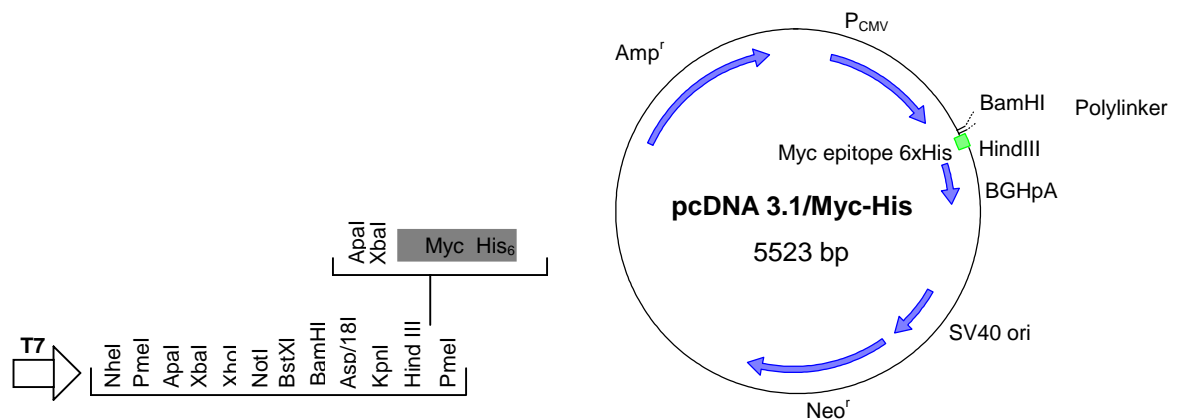


Abb. 10 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1/Myc-His

(Abkürzungen siehe Text zu 3.14.4). Die Polylinkerregion mit Myc-His₆ Epitop ist vergrößert dargestellt.

3.14.6 Das eukaryotische Expressionskonstrukt pRc/CMV-gH

Das Konstrukt pRc/CMV-gH (Abb. 11) entstand durch Subklonierung eines 2,5 kb-Fragments, welches das HCMV-gH-Gen (gpUL75) enthält, mittels BamHI- und ApaI-Partial-Restriktion aus dem Vektorkonstrukt pUC18-gH (Marko Reschke, Diplomarbeit 1990). Das Konstrukt wurde für die transiente Transfektion in Cos7- und U373-Zellen verwendet.

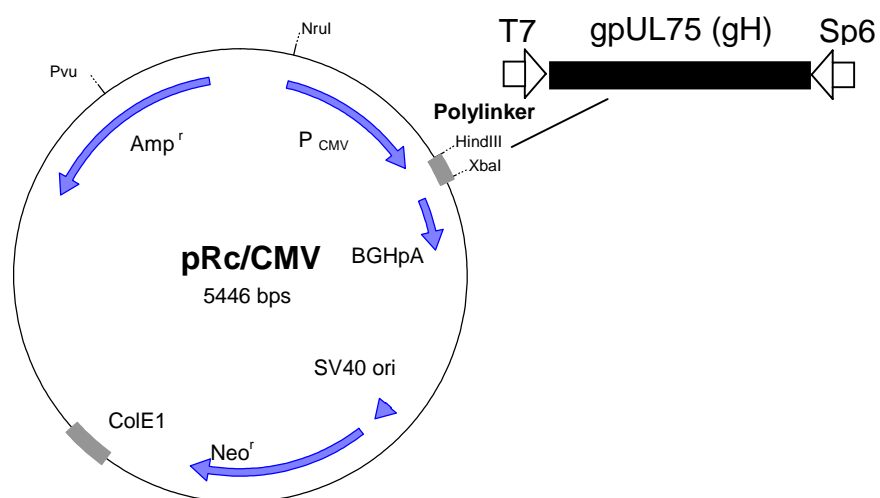


Abb.11 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pRc/CMV mit inseriertem gpUL75 (gH)-Anteil. (Abkürzungen siehe Text zu 3.14.4).

3.14.7 Der Vektor pIG-1

Der eukaryotische Expressionsvektor pIG-1 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Garten (Institut für Virologie, Marburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält das Aminoglykosid-Phospho-transferase-3'-Gen, das als Neomycin-Resistenz (Neo^r) zur Selektion in eukaryotischen Transformanten eingesetzt werden kann. Der Vektor wurde für Cotransfektionen mit Vektoren, die keinen eukaryotischen Selektionsmarker enthalten, verwendet.

3.14.8 Das Vektorkonstrukt pBlue-VSV-G

Das Vektorkonstrukt pBluescript-VSV-G (pBlue-VSV-G) (Abb. 12) wurde freundlicherweise von Dr. Ralf Wagner (Institut für Virologie, Marburg) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt entstand durch Klonierung des Glykoprotein G-Gens (G) des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), Serotyp Indiana mittels XbaI-XhoI-Restriktion in die Polylinkerregion des Phagemid-Vektors pBluescript KS (+) der Firma Stratagene, La Jolla, USA.

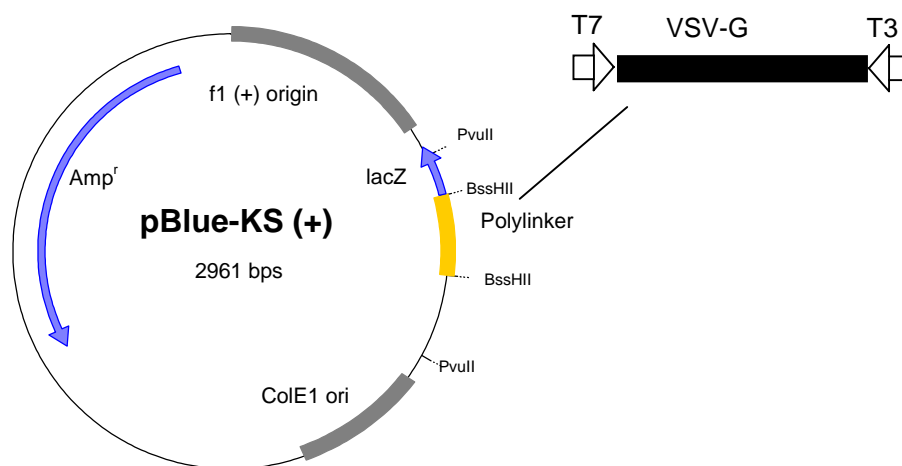


Abb. 12 Schematische Darstellung des Vektors pBlue-KS (+) mit inseriertem VSV-G-Gen

Dargestellt sind der ColE1 ori, der f1(+) ori, das lacZ-Gen, die Amp^r, sowie die Polylinkerregion, die von T7- und T3-Promotoren flankiert wird. (Abkürzungen siehe Text zu 3.14.9)

3.14.9 Der Vektor pGEM®-T

Der Vektor pGEM®-T (Abb. 13) wurde von der Firma Promega, Mannheim bezogen. Der etwa 3 kb große Vektor ermöglicht die direkte Klonierung von PCR-Amplifikaten, die an ihren 3' Enden einzelne Desoxyadenosine tragen, über einen 3' Thymidinüberhang, der sich stromaufwärts und stromabwärts der Polylinkerregion befindet. Die Polylinkerregion befindet sich in der α -Peptidkodierenden Region der β -Galaktosidase (*lacZ*), wodurch ein Blau-Weiß-„Screening“ in α -komplementierenden *E.coli*-Zellen ermöglicht wird, und wird durch den T7 und den Sp6 RNA Polymerase Promotor flankiert. Ferner verfügt der Vektor über einen ori des filamentösen Phagen f1 (*f1 ori*), der zur Präparation einzelsträngiger DNA genutzt werden kann.

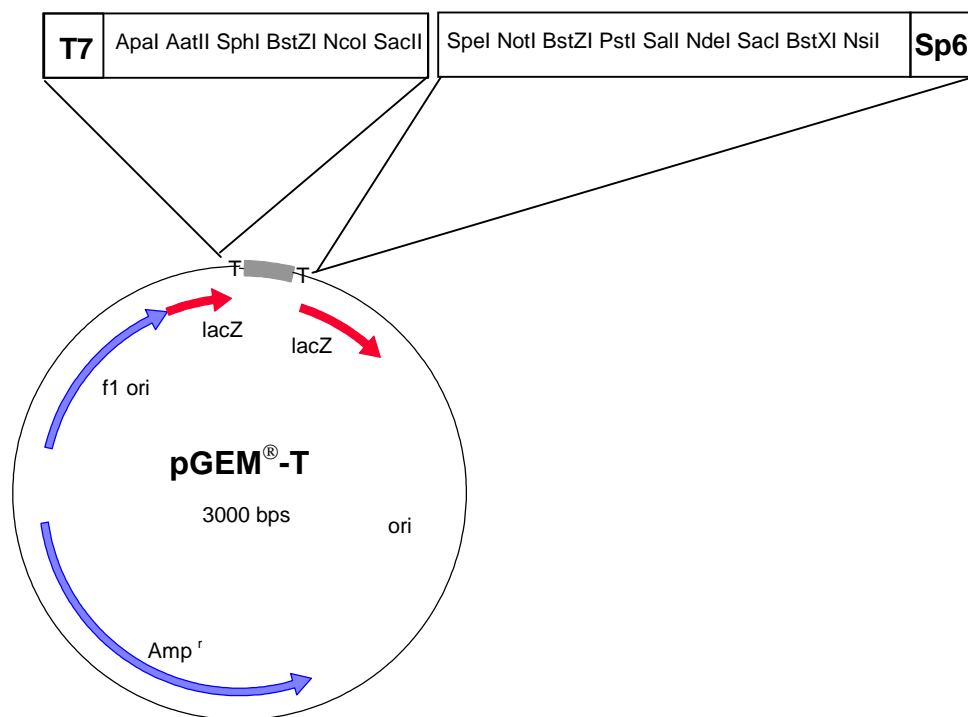


Abb. 13 Schematische Darstellung des Vektors pGEM®-T

Dargestellt ist der ori zur Amplifikation in *E. coli*-Zellen (*ori*), der f1 ori, das β -Laktamase Gen (*Amp^r*), das *lacZ*-Gen, sowie die Polylinkerregion mit Thymidin-Überhang (T). Die Polylinkerregion ist vergrößert dargestellt. (Abkürzungen siehe Text)

3.15 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen und sowohl für Sequenzierungsreaktionen als auch für Polymerasekettenreaktionen eingesetzt. Die Nukleotidpositionen der HCMV-Gene beziehen sich auf die publizierte Sequenz des Humanen Cytomegalievirus Stamms AD169 (Chee *et al.*, 1990). Die Nummerierung der Nukleotide der Vektoren beginnt mit dem ersten Nukleotid der entsprechenden Vektorkarte, bzw. mit dem ersten Nukleotid des Startcodons des inserierten Gens. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

3.15.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>	<u>Nukleotidposition</u>
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	
Sp6 Promotor	GATTTAGGTGACACTATAG	
BGH polyA	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
pGEX-f	TATAGCATGGCCTTTGCAGG	851
pGEX-r	ATGTGTCAGAGGTTTTTCACC	1045
gL648-f	GAGGGCATCACACTCTTTTAC	648

3.15.2 Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>	<u>Nukleotidposition</u>
gL-f	<u>CGGGATCC</u> ATGTGCCGCC GCCGCCCGG	164530
gL-r	<u>CCCAAGCTT</u> GCGAGCATCC ACTGCTTGAGG	163694
gB-f	<u>CCATCGATC</u> CAGTCTGAAT ATCACTCATAGGACCA	2459 (pRc/CMV-gB)

gB-r	AGTATAGATCAAATAAGTGA	4434
	TAATGACTACGGCTATGGC	(pRc/CMV-gB)
VSV-G-f	TTGATCTATACTATCCATCTT	1457
	TGCATTAAATTAAAGCACACC	(VSV-G)
VSV-G-r	GCTCTAGATTACTTTCCAAGT	1536
	CGGTTCATCTCTATGTC	(VSV-G)
gBAD2-f	CTGGGATCCGCCAACGAGACT	1317
	ATCTACAACACTACC	(pRc/CMV-gB)
gBAD2-r	CCGCTCGAGTTAAGTGTTGAC	1418
	TCCCACACAATCTCC	(pRc/CMV-gB)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Standardverfahren

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.*, 1989.

4.1.1 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

4.1.1.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAprep Spin Kit“ der Firma Qiagen, Hilden. Bei dieser Methode werden die Bakterien mit Hilfe einer modifizierten alkalischen Lyse aufgeschlossen und die doppelsträngige Plasmid-DNA durch reversible Bindung an eine Silicamembran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen gereinigt. Zur Plasmidpräparation wurde 5 ml LB^{Amp}-Medium mit einer transformierten *E. coli* Kolonie beimpft und ÜN bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser ÜN-Kultur wurden bei 13.000 rpm 5 min bei RT zentrifugiert (Minifuge T, Heraeus). Das Pellet wurde anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers lysiert und die Plasmid-DNA gereinigt. Im Anschluss an die Reinigung wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl EB-Puffer durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min bei RT von der Silicamembran eluiert und bei 4°C für einige Tage oder bei –20°C für längere Zeit gelagert.

4.1.1.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA im großen Maßstab

Für die Gewinnung großer DNA-Mengen (300-500 µg) wurde das “QIAFilter Plasmid Maxi Kit” der Firma Qiagen, Hilden, verwendet. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt hierbei über eine Anionenaustauschersäule. Die eluierte DNA wird anschließend durch Isopropanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und in EB-Puffer resuspendiert. 100 ml einer ÜN in LB^{Amp}-Medium gezogener Bakterienkultur wurden 15 min bei 4000 rpm (Rotina 48R, Hettich) und 4°C zentrifugiert.

Der Aufschluss des Bakterienpellets und die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Nach der Reinigung und Fällung wurde die Plasmid-DNA in EB-Puffer resuspendiert, die DNA-Konzentration bestimmt (s. 4.1.2) und die DNA auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl mit EB-Puffer eingestellt.

LB^{Amp}

siehe 3.10

EB-Puffer

Tris-HCL (pH 8,5)

10 mM

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia) in einer Quarzküvette (500 µl Füllvolumen, 1 cm Lichtweg). Um den linearen Messbereich von 0,01-0,8 einzuhalten, wurden die DNA-Lösungen in EB-Puffer entsprechend verdünnt (Verdünnungsfaktor 10-100). Für die Konzentrationsberechnung doppelsträngiger DNA gilt hierbei folgende Beziehung:

$E_{260\text{nm}} = 1,0$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
(Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.3 Endonuklease-Restriktion von DNA

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle und Analyse bzw. zur Präparation definierter DNA-Abschnitte und PCR-Amplifikate mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Für analytische Restriktionen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

DNA	0,1-1,0 µg
Puffer (10x)	1 µl
Restriktionsendonuklease	1-5 Einheiten
<i>aqua bidest</i>	<i>ad</i> 10 µl

Der Ansatz wurde für 90 min bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Für quantitative Restriktionen wurden 1-20 µg DNA mit 1-15 Einheiten der jeweiligen Restriktionsendonuklease in einem entsprechend großen Gesamtvolumen für 90-120 min bei optimaler Temperatur inkubiert.

4.1.4 Fällen und Konzentrieren von Nukleinsäuren

Linearisierte Plasmide wurden mit 0,1 VT 4 M LiCl und 1 VT Isopropanol für mindestens 10 min bei RT inkubiert, danach 10 min bei 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die gefällte DNA wurde getrocknet und in einem geeigneten Volumen EB-Puffer aufgenommen. Endonuklease-behandelte PCR-Amplifikate, die kleiner als 1000 bp waren, wurden mittels Ammoniumacetat gefällt. Der Ansatz wurde mit 0,5 VT 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 VT Ethanol versetzt und mindestens 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA 30 min bei 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen EB-Puffer aufgenommen. Die ankonzentrierten linearisierten Plasmide und PCR-Fragmente wurden für Ligationen eingesetzt.

EB-Puffer

siehe 4.1.1.2

4.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung wurde zur Identifizierung Endonuklease-geschnittener Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikate oder der anschließenden präparativen Gewinnung dieser DNA-Fragmente eingesetzt.

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1-2%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben sowie 0,25 µg eines DNA-Längenstandards (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, aufgetragen und in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Minigelkammer, Biorad) in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt.

Um die DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) darstellen zu können, wurde den Agarosegelen Ethidiumbromid als DNA-interkalierendes Agens in einer Konzentration von $0,125 \text{ }\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Das erhaltene Bandenmuster wurde photographisch dokumentiert. Bei präparativen Ansätzen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend aus dem Gel eluiert (s. 4.1.6).

TAE-Puffer

siehe 3.11

DNA-Ladepuffer (6x)

Glycerin	30,00% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
<i>ad aqua bidest.</i>	

4.1.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction“ Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Das System basiert auf der Bindung von DNA an Silicamembran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in $50 \text{ }\mu\text{l}$ EB-Puffer eluiert und für Ligationen eingesetzt.

EB-Puffer

siehe 4.1.1.2

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit Insert-DNA wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach) verwendet, welches unter ATP-Hydrolyse die Verbindung von 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen katalysiert. Je nach Größe des zu klonierenden Inserts wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:3-1:10 eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von $10 \text{ }\mu\text{l}$ wurden etwa 10 ng linearisierte Vektor-DNA mit einer entsprechenden Menge Insert-DNA, $1 \text{ }\mu\text{l}$ 10x Ligasepuffer und 1 Einheit T4-DNA-Ligase ÜN bei 16°C inkubiert.

4.1.8 Transformation von *E.coli*

4.1.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und auf dem Schüttler bis zu einer $OD_{595nm} = 0,5-0,8$ inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2750 rpm (Rotina 48R, Hettich) für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis für die Transformation eingesetzt.

LB-Medium

siehe 3.10

TSS-Puffer, pH 6,5

LB-Medium	85 % (w/v)
Polyethylenglykol 800	10 % (w/v)
DMSO	5 % (w/v)
MgCl ₂	50,00 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

4.1.8.2 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit 0,1-10 ng Plasmid-DNA in wässriger Lösung gemischt und für 40 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und anschließender dreiminütiger Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen zur Ausbildung der Ampicillinresistenz 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Selektion plasmidtragender Klone wurden 100 µl und 900 µl des Ansatzes auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

LB-Medium, LB-Agar^{Amp}

siehe 3.10

4.1.9 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Abschnitten

4.1.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich definierte DNA-Abschnitte in vitro unter Verwendung zweier antiparallel hybridisierender Oligonukleotide spezifisch und exponentiell amplifizieren (Mullis & Faloona, 1987). Die Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert, die eine zyklische Abfolge von Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA-Matrize und Kettenverlängerung bei der jeweils optimalen Temperatur ermöglicht.

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus viraler Matrizen-DNA wurde unter Verwendung des „AdvantageTM Genomic PCR Kit“ (Clontech, Heidelberg) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR aus vektorieller Matrizen-DNA erfolgte unter Verwendung des „Taq-PCR-Core Kit“ (Qiagen, Hilden). Für die PCR wurden 20-100 ng Matrizen-DNA in einem Volumen von 1 µl eingesetzt. Die Proben wurden mit 99 µl Reaktionsgemisch vermischt und zur Amplifikation in 200 µl Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, Weiterstadt) inkubiert. Zur vollständigen Denaturierung wurde der Ansatz zu Beginn des Amplifikationszyklus für 3 min bei 94°C inkubiert. Anschließend begann der folgende Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation, der 30mal wiederholt wurde.

Reaktionszyklus

Denaturierung:	94°C	30 sec
Hybridisierung:	55-60°C	30 sec
(je nach T _m des Oligonukleotids)		
Polymerisation:	72°C	60 sec

Eine anschließende zehnminütige Inkubation bei 72°C gewährleistete, dass die Amplifikate vervollständigt wurden, bevor die Reaktion beendet und das Reaktionsgefäß auf 4°C abgekühlt wurde. Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (s. 4.1.5).

Reaktionsgemisch

<u>Komponenten</u>	<u>Endkonzentration</u>
PCR-Puffer (10x)	1x
dNTP-Mix (je 10 mM)	200 µM
Oligonukleotid1	0,1-0,5 µM
Oligonukleotid2	0,1-0,5 µM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten
<i>ad aqua bidest.</i>	

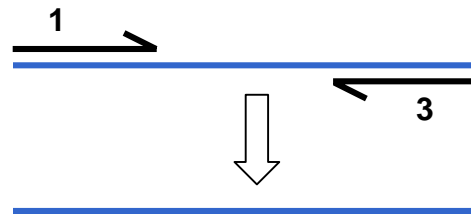
4.1.9.2 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Enzym, Oligonukleotiden und Salzen aus abgeschlossenen PCR-Reaktionsansätzen, sowie zur Entsalzung von Endonuklease-geschnittener DNA wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

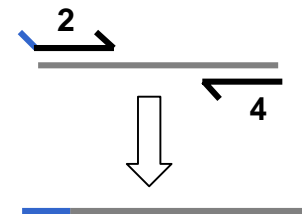
4.1.9.3 Mutagenese durch rekombinante PCR

Die Mutagenese durch rekombinante PCR wurde zur Herstellung einer chimären DNA verwendet. Dabei wurde ein definierter Bereich eines DNA-Abschnittes deletiert und durch einen anderen DNA-Abschnitt ersetzt. In zwei unabhängigen PCR-Reaktionen wurden zunächst die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert (Abb. 14). Das Oligonukleotid 2 trägt hierbei einen Abschnitt von 12 überhängenden Basenpaaren am 5' Ende, der zu der Sequenz des ersten PCR-Amplifikats stromaufwärts der Deletion homolog ist. Es entstehen zwei DNA-Amplifikate, von denen das zweite an seinem 5' Ende einen zum Fragment 1 komplementären Basenpaarüberhang besitzt. In einer dritten PCR, die mit den äußeren beiden Oligonukleotiden (Oligonukleotide 1 und 4) durchgeführt wird, werden beide PCR-Amplifikate als Matrizen-DNA eingesetzt. Nach erfolgter Denaturierung werden während der Hybridisierung beide DNA-Fragmente über den 5' Basenpaarüberhang des Fragments 2 miteinander verbunden. Gleichzeitig kommt es zur Hybridisierung beider äußeren Oligonukleotide, so dass in der folgenden Polymerisation das gewünschte chimäre Produkt entsteht.

PCR-1:



PCR-2:



PCR-3:

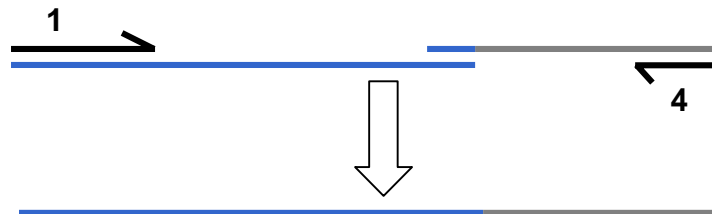


Abb. 14 Schematische Darstellung der rekombinanten PCR

4.1.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde zur Kontrolle von Klonierungen und Subklonierungen und zum Nachweis erfolgter Mutagenese nach einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde die AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, USA) und der ABI PRISM[™] BigDye Terminator Cycle Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

4.1.10.1 Sequenzierreaktion

Die Reaktion basiert auf Verlängerung von Oligonukleotiden und Kettenabbruch mit einem Gemisch aus fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotiden (ddNTP) und unmarkierten Desoxyribonukleotiden (dNTP). Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, so dass die zu

sequenzierende Probe in einer Gelspur aufgetrennt werden kann. Der Sequenzieransatz setzte sich zusammen aus 0,5-1,5 µg der zu sequenzierenden DNA, 10 pmol des Sequenzier-Oligonukleotids sowie 4 µl des „Terminator Cycle Ready Reaction Mix“, der den Reaktionspuffer mit Polymerase, dNTPs und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs enthielt und wurde mit *aqua bidest* auf 20 µl Gesamtvolumen gebracht. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Das Programm umfasste 25 Zyklen:

Denaturierung:	96°C	30 sec
Hybridisierung:	50°C	30 sec
Polymerisation:	60°C	4 min

Nach Abschluss der Reaktion wurde die Probe mit *aqua bidest* auf 100 µl Gesamtvolumen gebracht und mit 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VT Ethanol gefällt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus). Das DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 4 µl Sequenzierproben-Puffer resuspendiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurde die DNA für 5 min bei 95°C denaturiert.

Sequenzierproben-Puffer

Formamid	80,00 % (w/v)
Dextranblau	1,00 % (w/v)
EDTA	5,00 mM
<i>ad aqua bidest</i>	

4.1.10.2 Sequenziergel und Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in einem 5%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel in 1x TBE-Puffer bei 1680 V, 50 mA und 51°C für 9 h. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte nach Digitalisierung der Emissionssignale mittels Argonlaser und Photosensoren unter Verwendung des ABI PRISM™ 377 Data Collection Programs.

TBE-Puffer

siehe 3.11

Harnstoff-Polyacrylamid-Lösung

Harnstoff	21,0 g
Acrylamid-Lösung (30%)	8,4 ml
TBE (10x)	6,0 ml
<i>aqua bidest</i>	<i>ad 20,0 ml</i>

4.2 Expression rekombinanter Proteine

4.2.1 Bakterielle Expression von Gluthathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (s. 3.13.2) verwendet, der sich durch eine Deletion des *ompT*-Gens, welches für eine Protease der äußeren Membran codiert und des *lon*-Gens, das für eine endoproteolytisch wirksame Protease codiert, auszeichnet (Grodberg & Dunn, 1988; Phillips *et al.*, 1984). Rekombinant exprimierte Proteine sind aufgrund dieser Eigenschaften weitestgehend vor Degradation geschützt.

Für die Expression wurden 100 ml LB^{Amp}-Medium (s. 3.10) 1:100 mit einer transformierten ÜN-Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₅₉₅=0,5-0,7 inkubiert. Nach erfolgter Induktion durch 0,2 mM IPTG und weiterer Inkubation bei 37°C für 2h wurde die Bakterienkultur zunächst für 20 min im Eisbad abgekühlt und anschließend 15 min bei 5000 rpm (Zentrifuge J2-21, Beckmann) bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS (s. 3.11) resuspendiert, bevor die Zellen durch Zugabe von 10 mg Lysozym, Inkubation für 30 min auf Eis unter Zugabe von 25 µl DNase (5mg/ml) und Protease-Inhibitoren (100 Einheiten Trasylol/ml, 0,3mM PMSF) durch dreimaliges Frieren-Tauen (Trockeneis/Ethanol) aufgeschlossen wurden. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 11.000 rpm (Zentrifuge J2-21, Beckmann) und 4°C konnten vorhandene Zelltrümmer sedimentiert werden. Der Überstand, der die löslichen exprimierten Proteine enthielt, wurde bei -80°C gelagert, oder sofort weiterverarbeitet.

4.2.1.1 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen mittels Glutathion Sepharose 4B

Die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wird durch die starke Bindung der Glutathion-S-Transferase an ihr Substrat Glutathion vermittelt. Dazu wird kovalent an Sepharose gebundenes Glutathion (Glutathion Sepharose 4B, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Zur Bindung des Fusionsproteins wurde die gemäß den Herstellerangaben vorbereitete Glutathion Sepharose (0,5 ml einer 50%igen Suspension) mit dem Probenüberstand für 90 min bei RT auf einem Drehrad inkubiert, anschließend 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 500 x g (Rotina 48R, Hettich) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die proteingebundene-Matrix zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen (5 min, 500 x g). Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit 1 ml reduziertem Glutathion pro Bettvolumen Matrix. Dazu wurde die proteingebundene Matrix mit dem Elutionspuffer für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 3 min bei 1000 rpm (Rotina 48R, Hettich) zentrifugiert. Zur vollständigen Elution des Fusionsproteins von der Matrix wurde der Elutionsschritt noch zweimal wiederholt. Um die Affinitätsreinigung mittels SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Coomassie-Färbung (s. 4.4.1.1) zu überprüfen, wurden vor und nach Bindung des Fusionsproteins an die Matrix, nach den Waschschritten, sowie nach Elution je 30 µl der Proben für anschließende Analysen in Protein-Ladepuffer aufgenommen.

Protein-Ladepuffer

siehe 4.4.1

4.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Fusionsproteinen wurde das „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ der Firma Pierce, Rockford, USA verwendet. Das Prinzip der Proteinbestimmung beruht auf einer Modifikation der Methode nach Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Dabei wird durch Interaktion von Proteinen mit dem in saurer Lösung vorliegendem Farbstoff Coomassie G-250 ein blauer Protein-Farbstoff-Komplex gebildet, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm liegt. Die Aufnahme einer Eichkurve erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA, 2 mg/ml) als Standard. Zur Messung wurde je 10 µl

der Proteinlösung mit 300 µl Reagenzlösung in einer 96-Well Kulturplatte gemischt und die Extinktion bei 595 nm mit Hilfe eines Plattenphotometers bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand der gemessenen Extinktion_{595nm} an der erstellten Eichgerade abgelesen.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Zellkulturtechniken

Für die Vermehrung von HCMV-Virionen sowie zur experimentellen Infektion wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF) verwendet. Für Transfektionsstudien und für die Etablierung des CAT-Reportergen-Fusionsassay wurden humane Astrocytomazellen (U373) kultiviert. Transfektionen zur Expressionskontrolle wurden in Cos-7 Zellen vorgenommen. Humane Fibroblasten sind Primärkulturen, die aus Säuglingspräputien gewonnen werden. U373-Zellen sind immortalisierte Zellen, deren Ursprung ein menschliches Astrocytom der Makroglia ist. Cos-7 Zellen sind immortalisierte Affen-CV-1-Zellen, die über ein integriertes, defektes SV 40-Genom, welches das virale T-Antigen exprimiert, verfügen. Nach Transfektion eines Plasmids, das einen SV 40 Replikationsstartpunkt (SV 40 ori) besitzt, erkennt das T-Antigen den viralen SV 40 ori und initiiert die Replikation des Plasmids. Durch die hohe Kopienzahl des Plasmids lässt sich die Expressionsrate des Fremdproteins stark erhöhen.

4.3.1.1 Kultivierung humaner Fibroblasten, U373- und Cos7-Zellen

Die Zellen wurden in Dulbecco's minimalem essentiellen Medium (DMEM) mit 10% FCS (v/v) bei konstanter Temperatur von 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Im konfluenten Stadium enthielten die verwendeten 75 cm²-Zellkulturflaschen ca. 6 x 10⁶ Zellen. Zum Passagieren der Zellen wurden die konfluent gewachsenen Monolayer nach Entfernung des Kulturmediums einmal mit einer auf 37°C erwärmten Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies, Eggenstein) gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:3 (HFF und U373) oder 1:5 (Cos-7) auf mit DMEM-Kulturmedium versehene Kulturflaschen verteilt.

DMEM-Kulturmedium

siehe 3.10

4.3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen über längere Zeiträume aufzubewahren, wurden diese in flüssigem Stickstoff, d. h. bei -196°C eingefroren. Dazu wurden subkonfluente gewachsene Monolayer mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche gelöst und mit eiskaltem FCS versetzt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm 5 min sedimentiert und in 2 ml DMEM-Kulturmedium mit 10% FCS und 10% Glycerin resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in Polypropylenröhrchen (Bio FreezeTM Vials, Costar, Cambridge, USA) überführt und über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Isolierbox bei -80°C langsam eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

Zum Auftauen wurden die Polypropylenröhrchen direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension sofort in eine 25 cm^2 -Flasche, die 5 ml vorgewärmtes DMEM-Kulturmedium enthielt, überführt.

4.3.1.3 Fusion von Zellen mittels Polyethylenglykol (PEG)

Um Zellen miteinander zu fusionieren, wurden die in 6-Well-Kulturplatten gewachsenen Monolayer einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 1 ml einer 50%igen Polyethylenglykol-Lösung in DMEM-Kulturmedium ohne FCS für zwei Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend dreimal gründlich mit PBS gewaschen und nach Zugabe von DMEM-Kulturmedium für 24-48 h bei 37°C weiter inkubiert. Die Syncytienbildung wurde entweder lichtmikroskopisch oder nach Lyse der Zellen im CAT-Assay (s. 4.3.8) überprüft.

4.3.2 Herstellung von Zellextrakten

Zur Gewinnung von Zellextrakten für Analysen mittels SDS-PAGE (s. 4.4.1) und anschließend Immunoblot (s. 4.5.1) wurden Monolayer-Kulturen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben vom Flaschenboden wurden die Zellen bei 12.000 rpm (Biofuge A, Heraeus) für 5 min bei 4°C sedimentiert, in einem entsprechenden Volumen Extraktionspuffer (Blanton & Tevethia, 1981) aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Branson Sonifer® B15, Branson, Danbury, USA) 30 sec bei voller Leistung und 4°C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge A, Heraeus) für 5 min und 4°C wurden nicht gelöste Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde aliquotiert, mit Protein-Ladepuffer versetzt und bei -20°C gelagert.

Protein-Ladepuffer

siehe 4.4.1

Extraktionspuffer (pH 9,0)

Tris-HCl	20,00 mM
NaCl	300,00 mM
MgCl ₂	0,50 mM
CaCl ₂	1,00 mM
EDTA	2,00 mM
NP-40	0,50 % (v/v)
Glycerin	10,00 % (w/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

4.3.3 Virusanzüchtung (Herstellung von HCMV-Stammsuspensionen)

Für die Anzucht des HCMV-Laborstamms AD169 wurden konfluente Monolayer humaner Vorhautfibroblasten in 175 cm² Flaschen verwendet. Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer „multiplicity of infection“ (moi) von 0,1 infiziert. Nach Zugabe von zellfreier Virussuspension in 10 ml DMEM-Kulturmedium ohne FCS und Inkubation von 1 h bei RT auf einem Schwenktisch wurde nicht adsorbiertes Virus abgenommen und die Zellen mit 30 ml DMEM-Kulturmedium und 2% FCS

bei 37°C inkubiert. Nachdem etwa 50% der Zellen einen cytopathischen Effekt aufwiesen (im Durchschnitt nach 5-6 Tagen), wurde das Kulturmedium erneuert. In der Regel konnte der virushaltige Kulturüberstand nach 9-10 Tagen geerntet werden. Durch Zentrifugation bei 3700 rpm für 5 min bei 4°C wurden noch vorhandene Zellbestandteile sedimentiert. Die zellfreie Virussuspension wurde anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.3.1 Titration von Virussuspensionen

Zur Bestimmung der infektiösen Einheiten der Virusstammsuspension wurde die Endpunktverdünnungs-Methode verwendet. Dazu wurden doppelt angesetzte, logarithmische Verdünnungen von 10^{-1} - 10^{-8} in DMEM-Kulturmedium mit 2% FCS hergestellt und zur Infektion von konfluenten Fibroblasten-Deckglaskulturen verwendet. Die Kulturen wurden für 24 h bei 37°C im CO₂ –begasten Brutschrank inkubiert. Der Virustiter wurde anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem monospezifischen, monoklonalen Antikörper gegen „immediate- early-Antigen“ (IE2) nachgewiesen. Die Virustiter lagen in der Regel zwischen 5×10^5 und 1×10^7 i.E./ml.

4.3.3.2 Experimentelle Virusinfektion

Zur Infektion von konfluenten U373- oder HFF-Monolayer-Kulturen wurden entweder zellfreie Virussuspensionen oder mittels Ultrazentrifugation ankonzentrierte Virionen verwendet. Zur Virus-Adsorption wurde ein definiertes Volumen der Virussuspension bzw. der resuspendierten Virionen in DMEM Kulturmedium ohne FCS auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Danach wurde das Inokulum abgenommen und durch DMEM-Kulturmedium mit 2% FCS ersetzt.

4.3.3.3 Virusankonzentrierung

Zur Konzentrierung von extrazellulären Virionen für zellbiologische und biochemische Untersuchungen wurden zellfreie Virussuspensionen für 90 min bei 100.000 x g (Ultrazentrifuge TL-100, Beckmann) sedimentiert und anschließend in einem geeigneten Volumen DMEM-Kulturmedium ohne FCS aufgenommen oder in Protein-Ladepuffer lysiert.

DMEM Kulturmedium

siehe 3.10

Protein-Ladepuffer

siehe 4.4.1

4.3.4 Herstellung von [³⁵S]-markiertem AD 169

Zur Herstellung von [³⁵S]-markiertem AD 169 wurden konfluente Monolayer von HFF-Zellen in 175 cm² Flaschen verwendet. Die Zellen wurden mit einer moi von 0,5 wie unter 4.3.3.2 beschrieben infiziert und ca. 2 Tage bei 37°C inkubiert, bis etwa 30-50% der Zellen einen cytopathischen Effekt aufwiesen. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 50 µCi/ml Redivue Pro-mix L-[³⁵S] in vitro cell labelling mix in 20 ml Methionin-Cystein-freiem Kulturmedium bei 37°C für ca. 2 Tage markiert. Der virushaltige Kulturüberstand wurde abgenommen und durch Zentrifugation bei 3700 rpm für 10 min bei 4°C (Rotina 48R, Hettich) von noch vorhandenen Zellbestandteilen getrennt. Der zellfreie Überstand wurde in SW 41 Zentrifugenröhrchen überführt und das Virus bei 100.000 x g 70 min bei 4°C sedimentiert. Das Virussediment wurde in 1 ml TN-Puffer resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C (SW 41) über eine 15%ige Sucroslösung (w/v) gereinigt. Das Virussediment wurde in 500 µl TN-Puffer resuspendiert und in Aliquots á 100 µl bei -80°C gelagert.

Methionin-Cysteinfreies Medium

Dulbeccos`s MEM ohne Methionin und Cystein

L-Glutamin	2,00 mM
FCS	2,00 % (v/v)
DMEM Kulturmedium	5,00 % (v/v)

TN-Puffer

Tris/HCl (pH7,4)	5,00 mM
NaCl	100,00 mM
<i>ad aqua bidest</i>	

4.3.4.1 Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität

Der Einbau von ^{35}S -Methionin/Cystein in Proteine wurde durch Szintillationsmessung säurefällbarer Proteine bestimmt. Dazu wurden 2 μl [^{35}S]-markiertes Virus, bzw. 10 μl Zellextrakt auf 3 MM Whatman-Filterplättchen getropft und getrocknet. Die Plättchen wurden für jeweils 5 min in 10%iger TCA (w/v), 5%iger TCA (w/v), vergälltem Ethanol und Diethylether gewaschen (Radsak *et al.*, 1985). Nachdem der Diethylether verdampft war, wurden die Filterplättchen in Szintillationsröhrchen überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Die Zerfälle pro Minute (cpm) wurden in einem Szintillationszähler (Beckmann LS1801) gemessen.

4.3.5 Attachment-Assay

Der Nachweis an Zellmembranproteine gebundener Virionen erfolgte mittels eines Attachment-Assays mit [^{35}S]-markiertem HCMV-AD169 (s. 4.3.4). Konfluente U373-Monolayer in 24-Well-Kulturgefäßen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30 min auf 4°C abgekühlt. Die Virussuspension wurde mit DMEM-Kulturmedium ohne FCS in einem Gesamtvolumen von 100 μl vorverdünnt (moi= 0,5) und zur Virus-Adsorption für 1 h bei 4°C auf den konfluenten Monolayern schwenkend inkubiert. Das nicht adsorbierte Virus wurde danach abgenommen, die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen und in 100 μl SDS-Lysispuffer 20 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen

abgeschabt und 30 min bei 13.000 rpm (Biofuge A, Heraeus) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, je 10 µl der Zellysate auf 3 MM Whatman-Filterplättchen aufgetropft und für die Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität (s. 4.3.4.1) mittels Szintillations-Messung weiter aufgearbeitet.

SDS-Lysispuffer

SDS	1% (w/v)
TritonX-100	1% (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

4.3.6 Transfektionstechniken

Das Einbringen von Fremd-DNA in Cos7-Zellen und U373-Zellen erfolgte mit kationischen Liposomen nach einer modifizierten Lipofectin-Methode (Felgner *et al.*, 1987) mit dem Lipofectin[®]-Reagenz der Firma Life Technologies, Eggenstein. Das Lipofectin[®]-Reagenz besteht aus einer 1:1 Liposomen-Lösung des kationischen Lipids N-[1-(2,3-dioleoyl-oxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-chlorid (DOTMA) und des Lipids Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) (Rose *et al.*, 1991). In Polysteren-Röhrchen wurde je 1 ml serumfreies Medium (OPTIMEM) vorgelegt und entweder 20 µl Lipofectin-Reagenz, oder 3 µg Plasmid-DNA zugegeben. Der Inhalt der Röhrchen wurde vereinigt, gemischt und zur Ausbildung von DNA-beladenen Liposomen für 30 min bei RT inkubiert. Cos7-Zellen/ U373-Zellen, die bis zu einer Konfluenz von 50% / 75% mit Deckgläschen in 6-Well-Kulturgefäßen kultiviert worden waren, wurden zweimal mit OPTIMEM gewaschen, bevor das Liposomen-DNA-Gemisch zu den Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Transfektionsmedium entfernt und zur Stimulation des Zellstoffwechsels durch DMEM Kulturmedium ersetzt.

DMEM Kulturmedium

siehe 3.10

4.3.6.1 Cotransfektionen

Für Transfektionen mit mehreren Plasmiden wurde die eingesetzte DNA-Menge bis auf 6 µg erhöht. Die Menge des Lipofectin®-Reagenz wurde entsprechend angepasst.

4.3.7 **Herstellung stabil exprimierender Zelllinien**

Stabil exprimierende Zelllinien werden durch plasmidgebundene Übertragung der gewünschten Gene in Verbindung mit einer Antibiotikaresistenz erzeugt. Dabei nutzt man das statistisch selten auftretende Ereignis aus, dass eine Zelle die vektorielle DNA nicht nur aufnimmt, sondern in das zelluläre Genom integriert. Nach erfolgter Integration des Plasmids in das zelluläre Genom wird durch die Aminoglykosid-Phosphotransferase eine Resistenz gegen das cytotoxische Neomycin-Analogon Geneticin ausgebildet, so dass transfizierte Zellen mit diesem Hemmstoff selektioniert werden können.

4.3.7.1 Transfektion von Astrocytomazellen mit anschließender Selektion

U373-Zellen wurden in 9 cm Petrischalen ausgesät und bis zur 50%igen Konfluenz angezüchtet. Die Transfektion erfolgte nach einer modifizierten Lipofectin-Methode mit dem Lipofectin®-Reagenz der Firma Life Technologies, Eggenstein (s. 4.3.6). 48 h nach Transfektion wurde dem Kulturmedium Geneticin in einer Konzentration von 800 µg/ml zugesetzt. Nach etwa drei Tagen starben die ersten nicht Geneticin-resistenten Zellen ab. Das Selektionsmedium wurde während der Absterbephase täglich gewechselt. Etwa nach 14 Tagen hatten sich aus Einzelzellen voneinander unabhängige Zellklone entwickelt, die unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Pipette in 24-Well-Zellkulturplatten überführt und nach Erreichen der Konfluenz in 6-Well-Kulturschalen ausgesät wurden. Die konfluenten Klone wurden in 25 cm²-Kulturflaschen überführt und unter ständigem Selektionsdruck weiter kultiviert. Zur Expressionskontrolle wurden die in den 6-Well-Kulturschalen verbliebenen Zellen weiter bis zur Konfluenz kultiviert und mittels SDS-PAGE (s.4.4.1) und Immunoblot (s. 4.5.1) auf korrekte Expression

des Fremdgens kontrolliert. Positive Zellklone wurden weiter passagiert und in niedrigen Passagen in flüssigem Stickstoff eingefroren (s. 4.3.1.2).

4.3.8 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Assay

Die Chloramphenicol-Acetyltransferase katalysiert die Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-CoA auf Chloramphenicol (CAMP). Die Messung der Enzymaktivität im Zellextrakt erfolgt durch einen CAT-Assay. Dazu wird das zu untersuchende Zell-Lysat mit Acetyl-CoA und [¹⁴C]-markiertem Chloramphenicol inkubiert. Nach Auftrennung mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC) können nicht-, mono- und diacetyliertes Chloramphenicol voneinander getrennt und durch anschließende Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Zur Gewinnung von Zellextrakten wurden Monolayerkulturen in 6-Well / 24-Well-Kulturgefäßen zunächst zweimal mit PBS (4°C) gewaschen, bevor die Zellen mit 150 µl/50 µl 1x Reporter-Lysis-Puffer (Promega, Madison, USA) 15 min bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert wurden. Die Zellen wurden abgeschabt und 2 min bei 10.000 rpm (Biofuge A, Heraeus) sedimentiert. Der enzymhaltige Überstand wurde abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für den CAT Assay wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Zellysat	18-75 µl
AcetylCoA (70 mg/ml)	1 µl
[¹⁴ C]-Chloramphenicol (25µCi/ml)	2 µl
0,25 M Tris/HCl (pH7,5)	ad 153 µl

Der Ansatz wurde gemischt und nach ÜN-Inkubation bei 37°C mit dem fünffachen Volumen Ethylacetat versetzt und erneut für 1 min gemischt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge A, Heraeus) für 2 min wurde die obere organische Phase in ein neues Eppendorfcup überführt und für 30 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Sediment wurde in 10 µl Ethylacetat resuspendiert und auf eine DC-Platte aufgetropft. Als Laufmittel für die DC wurde Chloroform/Methanol im Verhältnis 19:1 eingesetzt. Die autoradiographische Auswertung erfolgte anhand

von Röntgenfilmen (BioMax, Kodak, New York, USA) oder an einem Biolumager (BAS 1000, Fuji, Kangawa, Japan) mit Hilfe der Software TINATM 4.0. Für quantitative Aussagen wurden die Prozente an monoacetyliertem Chloramphenicol, bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität, berechnet und graphisch dargestellt (% monoacetyliertes CAMP).

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970; Gallwitz *et al.*, 1978). Abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurden 8-15%ige Polyacrylamid-Trenngele mit einem 3,75%igem Polyacrylamid-Sammelgel verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit ¼ Volumen 4x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zum Sammeln der Probenfront zunächst bei 100 V, danach bei 150 V in einer Minigelkammer (Biorad, München) mit 1x Elektrophoresepuffer durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front die untere Kante des Gels erreicht hatte. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine wurde ein farbig markierter Molekulargewichtsmarker (RainbowTM-protein-molecular-weight-marker, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt.

Elektrophoresepuffer

Glycin	200,00 mM
Tris	25,00 mM
SDS	0,10 %
<i>ad aqua bidest</i>	

Protein-Ladepuffer (4x, reduzierend)

Tris-HCl (pH 6,8)	200,00 mM
β-Mercaptoethanol	4,00 % (w/v)
SDS	4,00 % (w/v)
Glycerin	40,00 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

Sammelgel

Acrylamid	3,75 % (w/v)
N, N'-Methylenbisacrylamid	0,10 % (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	125,00 mM
SDS	0,10 % (w/v)
APS	0,04 % (w/v)
TEMED	0,10 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

Trenngel (8-15 %)

Acrylamid	8-15 % (w/v)
N, N'-Methylenbisacrylamid	0,21 % (w/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	370,00 mM
Glycerin (87%)	5,00 % (v/v)
SDS	0,10 % (w/v)
APS	0,10 % (w/v)
TEMED	0,10 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

Rainbow™-protein-molecular-weight marker (MW 220.000-14.300; 46.000-2350)

Myosin	(220,00 kDa)	
Phosphorylaseb	(97,40 kDa)	
BSA	(66,00 kDa)	
Ovalbumin	(46,00 kDa)	
Carboanhydrase	(30,00 kDa)	
Trypsin-Inhibitor	(21,50 kDa)	
Lysozym	(14,30 kDa)	
Aprotinin	(6,50 kDa)	
Insulin β-Kette	(3,40 kDa)	
Insulin α-Kette	(2,35 kDa)	
in 50%iger Glycerinlösung		je 1,0 mg/ml

4.4.1.1 Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Polyacrylamid-Gele zur Fixierung und Färbung der Proteine für mehrere Stunden in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte in einer Methanol-Essigsäure-Lösung.

Coomassie- Färbelösung

Coomassie brilliant blue G-250	1,00 g
Methanol	40,00 %
Eisessig	10,00 %
<i>ad aqua bidest</i>	

Methanol-Essigsäure-Lösung

Essigsäure	10,00 % (v/v)
Methanol	40,00 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

4.5 Immunologische Methoden

4.5.1 Immunoblot

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden diese im Anschluss an die SDS-PAGE (s. 4.4.1) mit Hilfe des Halbtrockenblot-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Dazu wurden zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, das Gel und drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) übereinander geschichtet. Der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche für 90 min. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch einstündige Inkubation in 10% Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween20 abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween20 wurde

die Membran 1 h mit dem in Antikörperpuffer verdünnten spezifischem Erstantikörper bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen und anschließend mit einem geeigneten in Antikörperpuffer verdünntem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal mit PBS/0,1% Tween20 und zweimal mit PBS gewaschen.

Der Nachweis spezifischer Proteinbanden erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL) mit dem „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce, Rockford, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei katalysiert die Peroxidase des Zweitantikörpers die Oxidation von Luminol, wodurch Licht entsteht, welches mit Hilfe eines Röntgenfilms (Biomax, Kodak) dokumentiert werden kann.

Anodenpuffer

Roti® Blot-A	10,00 % (v/v)
Methanol	20,00 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

Kathodenpuffer

Roti® Blot-K	10,00 % (v/v)
Methanol	20,00 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

PBS/0,1% Tween20

PBS	siehe 3.11
Tween20	0,100 % (v/v)

Antikörperpuffer

Magermilchpulver	1,00 % (w/v)
PBS/0,1% Tween20	

4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen transfizierter und infizierter Zellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurden entweder einer Acetonfixierung zur Analyse der intrazellulären Expression oder einer Paraformaldehydfixierung zur Untersuchung der Oberflächenexpression unterzogen.

4.5.2.1 Acetonfixierung

Die Deckglaskulturen wurden zunächst in PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch Zugabe eines -20°C kalten Aceton/Methanol-Gemisches für 10 min fixiert. Nach Entfernen und Abdampfen des Fixierungsgemisches wurden die Deckglaskulturen 15 min in BSA-Puffer rehydriert und anschließend mit dem spezifischen Erstantikörper (in BSA-Puffer) 30-60 min bei RT inkubiert. Die Deckglaskulturen wurden erneut in PBS gewaschen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Zweitantikörper (in BSA-Puffer) für weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Präparate in PBS und *aqua bidest* gewaschen und mit Mowiol eingedeckt.

BSA-Puffer (pH 7,4)

BSA	3,00 % (w/v)
NaCl	200,00 mM
NaN ₃	0,02 % (w/v)
PBS-Puffer	

4.5.2.2 Paraformaldehydfixierung

Die in PBS⁺⁺ gewaschenen Deckglaskulturen wurden für 20 min in einer 3%igen Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal in PBS⁺⁺ gewaschen und zur Absättigung freier Aldehydgruppen des Paraformaldehyds für 10 min in einer 50 mM NH₄Cl-Lösung inkubiert. Nach fünfminütigem Waschen in PBS⁺⁺ konnten die Zellen entweder für eine Oberflächenimmunfluoreszenz mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert werden oder die Zellen wurden durch fünfminütige Inkubation in PBS⁺⁺/0,2% Triton X-100 (v/v)

permeabilisiert und erneut in PBS⁺⁺ gewaschen. Die Inkubation mit Erst- und Zweitantikörpern erfolgte wie unter 4.5.2.1 beschrieben.

PBS⁺⁺Puffer (pH 7,4)

siehe 3.11

Paraformaldehydlösung (pH 7,4)

Paraformaldehyd
PBS⁺⁺Puffer

3 % (w/v)

NH₄Cl-Lösung (10x)

NH₄Cl
PBS⁺⁺Puffer

500,00 mM

4.5.2.3 Modifizierte Oberflächen-Immunfluoreszenz

Der Nachweis an der Zelloberfläche gebundener Proteine erfolgte durch Bindung des Erstantikörpers an lebende Zellen bei 4°C. Bei dieser Temperatur kann keine Endocytose der Antigen-Antikörper-Komplexe stattfinden. Dazu wurden die auf Eis inkubierten Deckglaskulturen in 24-Well-Zellkulturplatten zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit 200 µl des spezifischen Erstantikörpers für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einer Acetonfixierung unterzogen und wie unter 4.5.2.1 beschrieben mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper inkubiert.

4.5.3 **Ammoniumsulfat-Präzipitation von Antikörper-Lösungen**

Das Ankonzentrieren von Antikörpern aus zellfreien Hybridomaüberständen wurde durch native Fällung mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Präzipitation erreicht. Definierte Volumina der Hybridomaüberstände wurden zunächst von noch vorhandenen Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei 3000 x g (Rotina48 R, Hettich) für 30 min bei RT getrennt. Der zellfreie Überstand wurde in ein Glasgefäß überführt und zur Ausfällung von nicht-Immunglobulinen unter ständigem Rühren mit 0,5 VT gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt

(etwa 40%ige Sättigung) und ÜN bei 4°C weitergerührt. Im Anschluss wurden die Präzipitate durch 30-minütige Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C (Rotina48 R, Hettich) sedimentiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde auf RT gebracht und durch langsame Zugabe von gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung auf eine Endkonzentration von 50% Sättigung eingestellt, bevor die Lösung ÜN bei 4°C weitergerührt wurde. Die Antikörperpräzipitate wurden durch Zentrifugation bei 3000 x g für 30 min bei 4°C sedimentiert und in 0,1 VT PBS (bezogen auf das Ausgangsvolumen) resuspendiert. Die Antikörperlösung wurde 16 h gegen das 1000fache Volumen an PBS mit dreimaligem Pufferwechsel dialysiert und anschließend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Funktionalität der ankonzentrierten Antikörper wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (s. 4.5.2) und Immunoblot (s. 4.5.1) überprüft.

PBS-Puffer

siehe 3.11

4.5.4 Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA) zur Quantifizierung humaner Immunglobuline (Ig)

Die Quantifizierung von humanen ammoniumsulfatpräzipitierten Immunglobulin G-Molekülen (IgG) erfolgte mittels eines Sandwich ELISA („Human IgG-Fc ELISA Quantitation“ Kit, NatuTec GmbH, Frankfurt). Bei dem Sandwich-Verfahren werden zwei Antikörper eingesetzt, die für zwei unterschiedliche Epitope eines Antigens spezifisch sind. Ein spezifischer Antikörper (Kopplungsantikörper) wird zunächst an eine Festphase kovalent gebunden. Das eingesetzte Antigen wird über diesen Antikörper fest gebunden und kann mit Hilfe eines zweiten enzymgekoppelten Antikörpers nach Zugabe von Substrat nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung humaner IgGs wurden als Kopplungsantikörper affinitäts-gereinigte Ziege Anti-Human-IgG-Fc-Fragmente (10 µg/ml) verwendet. Diese wurden mit Kopplungspuffer 1:100 verdünnt und je 100 µl der Lösung wurde in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Nach Antikörperkopplung für 60 min bei 37°C wurde die Platte zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 200 µl einer 1%igen BSA-Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden

verschiedene Verdünnungen (1000 ng/ml-7,8 ng/ml in Probenverdünnungspuffer) eines humanen Serum-Kalibrators (IgG= 5,27 mg/ml) hergestellt. Um Messwerte im linearen Messbereich zu erhalten, wurden die Testantikörper ebenfalls in Probenverdünnungspuffer verdünnt (Verdünnungsfaktor 30-3750). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden je 100 µl der Testantikörper- bzw. der Calibrator-Verdünnungen in die Vertiefungen pipettiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl HRP-gekoppelten Ziege Anti-Human-F_c-Fragmenten (1:80.000 in Probenverdünnungspuffer) für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer wurden nicht gebundene Antikörper entfernt, bevor je 100 µl Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Sigma, Deisenhofen) in die Vertiefungen pipettiert wurden. Nach 5 min wurde die Reaktion mit je 100 µl Stopp-Lösung (3M H₂SO₄) abgestoppt und die Platten in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

Kopplungspuffer (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	
<i>ad aqua bidest</i>	50,00 mM

Waschpuffer

Tris-HCl (pH 8,0)	50,00 mM
NaCl	140,00 mM
Tween20	0,05 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

1% BSA-Lösung

BSA	1,00 % (w/v)
Tris-HCl (pH 8,0)	50,00 mM
NaCl	150,00 mM
<i>ad aqua bidest</i>	

Probenverdünnungspuffer

Tween20	0,05 % (v/v)
1 % BSA-Lösung	

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Fusionsassays zur Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion

Voraussetzung für die Untersuchung der Fusionsaktivität des Humanen Cytomegalievirus war die Etablierung eines aussagefähigen, reproduzierbaren Fusionsassay.

Die klassischen Methoden zur Untersuchung von Virus-Membran-Fusionsvorgängen basieren auf der lichtmikroskopischen Auszählung von mehrkernigen Zellen (Polykaryen), die das Ergebnis einer virus-induzierten Zell-Zell-Fusion (Syncytienbildung) darstellen. Problematisch hierbei ist zum einem, dass diese Methode nicht sensitiv genug ist, da nur Syncytien mit mehr als fünf Kernen ausgezählt werden und schwächere Fusionsereignisse nicht erfasst werden, zum anderen kommt es je nach verwendeter Zelllinie zu spontanen Zell-Zell-Fusionen, so dass zwischen virus- und nicht-virus-induzierten Syncytien nicht unterschieden werden kann.

Sensitivere Methoden zur Untersuchung von virusinduzierten Fusionsereignissen sind Reporter-gen-Aktivierungs-Assays, die zumeist die β -Galaktosidase als Reporter verwenden und nach dem Prinzip der Transkriptionsaktivierung arbeiten. Für das Humane Cytomegalievirus wurde ein solches System jedoch bisher nicht beschrieben.

Als Alternative zu bereits existierenden Reporter-gen-Aktivierungs-Assays wurde daher ein neuer Assay für das HCMV-System etabliert, der die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reporter-gen nutzt.

Die Kriterien für die Auswahl der für Fusionsuntersuchungen geeigneten Zellen waren primär die Permissivität für das HCMV, sowie die Transformierbarkeit der Zellen. Beide Eigenschaften wurden nur durch Astrocytomazellen (U373) erfüllt. Der Infektionszyklus in U373-Zellen ist, verglichen mit dem primärer Fibroblasten, länger und beträgt etwa 96 h (Reis *et al.*, 1993). Auch die Virusfreisetzung in U373-Zellen ist verlangsamt, jedoch sind die entstehenden Partikel in ihrer Infektiösität nicht beeinträchtigt (Kari *et al.*, 1992).

5.1.1 Prinzip des CAT-Reporter-gen-Aktivierungs-Assay

Für den CAT-Reporter-gen-Aktivierungs-Assay wurden die Konstrukte pG5CAT und pM3-VP16 (s. 3.14.1/ 3.14.2) verwendet.

Nach solitärer transienter Transfektion der Konstrukte in eukaryotische Zellen wird in einer der Zellpopulationen das CAT-Gen zur Verfügung gestellt, während es in der anderen Population zur Expression des GAL4-VP16 Transaktivators kommt. Nach Fusion der Transaktivator-exprimierenden Zellen mit den Reporter-gen-Zellen kann der Transaktivator mittels des GAL4-NLS in den Zellkern der Reporter-gen-Zellen gelangen und dort an die GAL4-Bindungsstellen binden und so die Transkription des CAT-Gens initiieren. Nach Transkriptionsaktivierung und anschließender CAT-Expression können Fusionsereignisse als CAT-Aktivität gemessen werden (Abb.15).

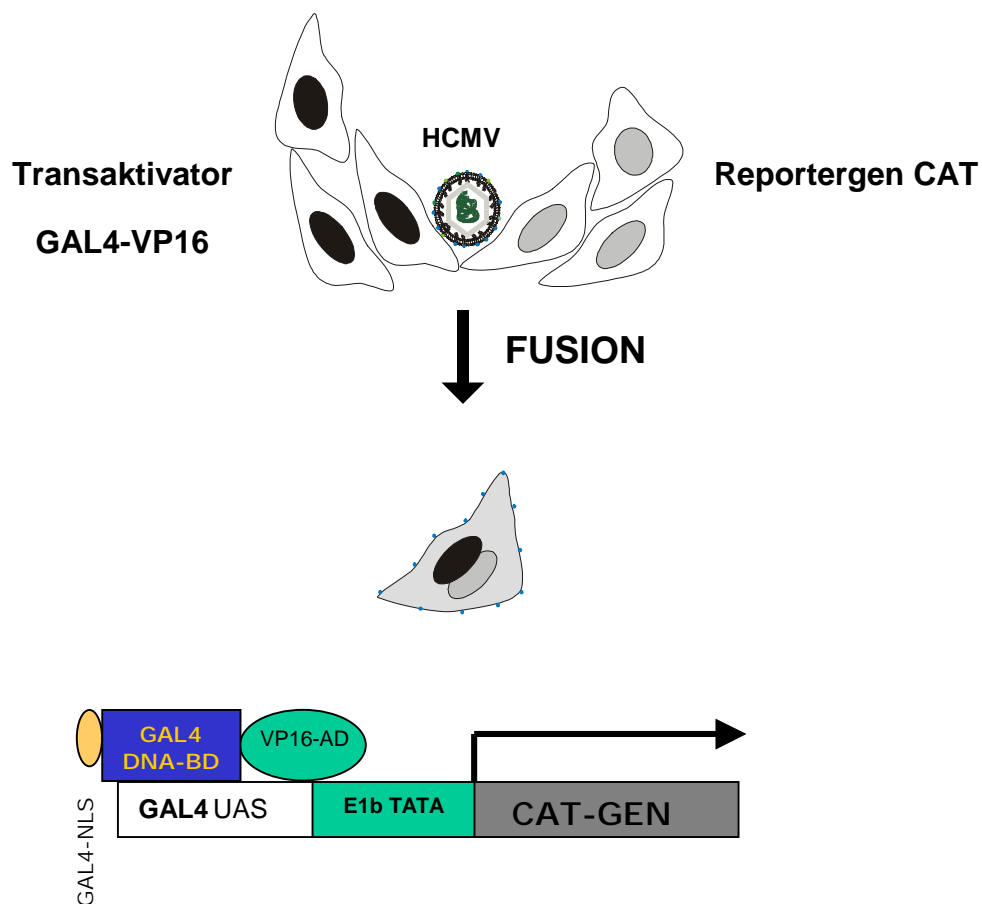


Abb.15 Schematische Darstellung des CAT-Reporter-gen-Aktivierungs-Assay

5.1.2 CAT-Expression im transienten System

Die Funktionalität des Reporter- und Transaktivator-Konstrukts wurde durch Lipofectin-vermittelte Cotransfektion (s. 4.3.6) beider Konstrukte in Astrocytomazellen (U373) und anschließendem CAT-Assay (s. 4.3.8) überprüft. Als Kontrolle wurden beide Konstrukte solitär transfiziert.

Zudem wurde durch solitäre transiente Transfektion und anschließender PEG-Fusion der kokultivierten Reporter- und Transaktivator-Zellen die grundsätzliche Eignung der U373-Zellen für einen Fusionsassay untersucht. Dazu wurden U373-Zellen 24-30 h nach Transfektion mit dem CAT-Reporter-Konstrukt (U373-CAT) abgelöst und mit den U373-VP16-Zellen für 12-18 h kokultiviert. Die Zellen wurden anschließend entweder nicht weiterbehandelt (Negativkontrolle) oder durch Zugabe von 50%iger Polyethylenglykol-Lösung fusioniert (s. 4.3.1.3). Nach weiteren 24-48 h wurden die Zellen geerntet und mittels CAT-Assay (s. 4.3.8) auf CAT-Expression analysiert.

Die Cotransfektion des CAT-Reporters mit dem Transaktivator GAL4/VP16 führte in U373-Zellen zu starker CAT-Expression und bestätigte die erfolgreiche Transkriptionsaktivierung des CAT-Gens durch den Transaktivator GAL4/VP16, während für die transienten Kontroll-Transfektionen mit dem Reporter oder dem Transaktivator keine CAT-Expression nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 16A).

Für die nicht kokultivierten CAT-Reporter-Zellen (U373-CAT) konnte keine bzw. nur sehr schwache CAT-Aktivität nachgewiesen werden, so dass eine Transkriptionsaktivierung durch zelluläre Faktoren ausgeschlossen wurde.

Die kokultivierten U373-CAT und U373-VP16 Zellen zeigten in Abhängigkeit von der Kokultivierungsdauer schwache bis stärkere CAT-Signale, die wahrscheinlich auf spontane Fusionen der Zellen zurückzuführen waren.

Die Auswertung der CAT-Assays für die solitären Transfektionen ergab, dass die Transkriptionsaktivierung des CAT-Gens durch den Transaktivator GAL4/VP16 nach PEG-Fusion eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 16B).

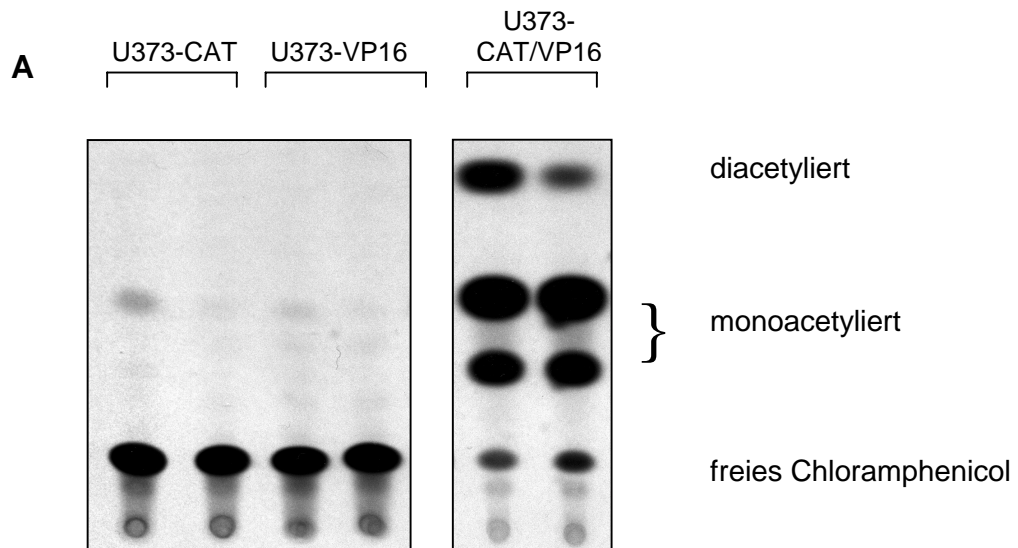


Abb. 16 A CAT-Expression nach solitärer und Cotransfektion von pG5CAT und pM3-VP16 in U373-Zellen

Solitär transfizierte (U373-CAT; U373-VP16) und cotransfizierte U373-Zellen (U373-CAT/VP16) in 60 mm²-Kulturschalen wurden 48 h nach Transfektion in 300 µl Lysispuffer lysiert, davon wurden je 75 µl und 7,5 µl für den CAT-Assay eingesetzt. Der Nachweis der CAT-Expression erfolgte nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Autoradiographie (Exposition 12 h).

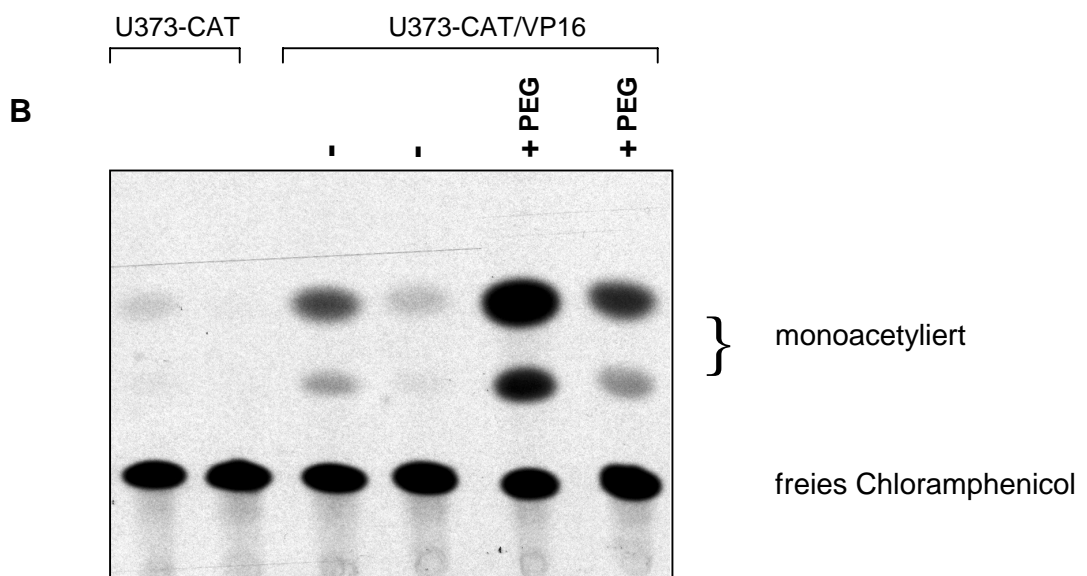


Abb. 16 B CAT-Expression von transient transfizierten U373-CAT/VP16 nach PEG-Fusion

Autoradiographie der DC-Platte nach CAT-Assay mit Extrakten aus unbehandelten transfizierten U373-CAT-Zellen und unbehandelten kokultivierten U373-CAT/VP16-Zellen (-), sowie PEG-fusionierten U373-CAT/VP16-Zellen (+PEG). Es wurde je 75 µl und 7,5 µl Zellextrakt eingesetzt (60 mm²-Kulturschalen, Lyse in 300 µl Lysispuffer).

Die prinzipiellen Voraussetzungen zur erfolgreichen Transkriptionsaktivierung des CAT-Gens durch den Transaktivator GAL/VP16 in U373-Zellen waren somit gegeben.

5.1.3 Herstellung stabil exprimierender U373-Transaktivator-Zellen und Reporterzellen

Während der transienten Transfektionsexperimente hatte sich gezeigt, dass vor allem bei den Kokultivierungen je nach Transfektionseffizienz des Transaktivators unterschiedlich starke Signale auftraten. Um eine bessere Standardisierung des Systems zu erreichen, wurden stabil transformierte Transaktivator- und Reporterzellen hergestellt.

Die Eignung für eine stabile Expression setzt die permanente Proliferation und Transformierbarkeit der Zellen voraus. Diese Anforderungen erfüllten die U373-Zellen. Aufgrund des fehlenden eukaryotischen Selektionsmarkers (Neo^r, Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen) der Konstrukte pG5CAT und pM3-VP16 wurden Cotransfektionen mit dem Konstrukt pIG-1, welches über das Neo^r-Gen verfügt, durchgeführt. Die Cotransfektionen der U373-Zellen erfolgten durch lipofectin-vermittelte Transfektion (s. 4.3.6). Durch Zugabe einer für nicht transfizierte Zellen letaler Konzentration Geneticin wurden Zellklone selektioniert, die das Neo^r-Gen in das zelluläre Genom integriert hatten und folglich die Aminoglykosid-Phosphotransferase exprimierten (s. 4.3.7).

Die Expression des ebenfalls in das zelluläre Genom inserierten Transaktivator-Gens (GAL4-VP16) wurde sowohl mittels indirekter Immunfluoreszenz (s. 4.5.2) als auch mittels Immunoblot (s. 4.5.1) mit einem spezifischen polyklonalen Anti-VP16 Antikörper untersucht.

Der Nachweis der Integration des Reportergens CAT erfolgte indirekt durch Kokultivierung der zu untersuchenden CAT-Zellklone mit positiven Transaktivator-Zellklonen, anschließender PEG-Fusion der Zellen (s. 4.3.1.3) und Auswertung mittels CAT-Assay (s. 4.3.8).

Da die Integration eines Plasmids in das zelluläre Genom ein zufälliges Ereignis darstellt, wurden neben ausschließlich geneticinresistenten Klonen auch Klone erhalten, die das CAT-Gen in Abwesenheit des Transaktivators exprimierten.

Zudem zeigte sich in Abhängigkeit des eingesetzten Transaktivator-Zellklons unterschiedlich starke CAT-Expression, so dass verschiedene Kombinationen aus Transaktivator-Zellklonen und Reporter-Gen-Zellklonen ausgetestet wurden. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Zellklone ausgewählt, die in Anwesenheit des Transaktivators eine optimale CAT-Expression zeigten.

5.1.4 Überprüfung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion im Reporter-Gen-Aktivierungs-Assay

Die Eignung der stabilen Reporter-Gen- und Transaktivator-Zellen zur Erfassung von HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusionsvorgängen wurde durch experimentelle Virus-Infektion von kokultivierten U373-CAT/VP16 Zellen und anschließendem CAT-Assay überprüft.

Die U373-VP16 und U373-CAT-Zellen wurden dazu im Verhältnis 1:1 in 6-Well-Kulturplatten (1×10^6 Zellen) ausgesät und im konfluenten Stadium mit zellfreiem nicht ankonzentriertem Virus ($\text{moi}=1,0$), wie unter 4.3.3.2 beschrieben, infiziert. Als Kontrollen wurden U373-CAT-Zellen ausgesät, sowie kokultivierte VP16/CAT-Zellen, die nicht weiterbehandelt wurden oder mittels PEG fusioniert wurden (Positivkontrolle). 24 h nach HCMV-Infektion bzw. PEG-Fusion wurden die Zellen in 150 μl Lysispuffer geerntet und die Zellysate mittels CAT-Assay (s. 4.3.8) analysiert.

Mit Hilfe des CAT-Reporter-Gen-Aktivierungs-Assay konnte im HCMV-Ansatz Zell-Zell-Fusion eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 17).

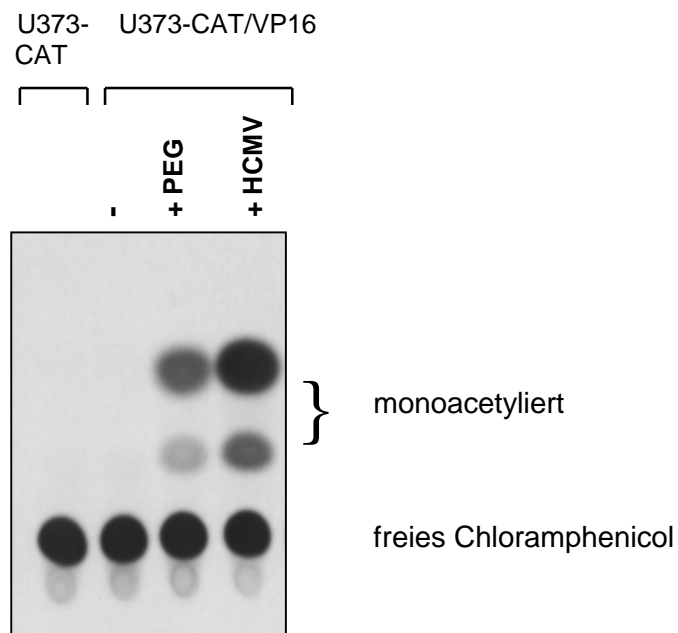


Abb. 17 CAT-Expression nach HCMV-vermittelter Zell-Zell-Fusion

Autoradiographie der acetylierten Produkte nach CAT-Assay und DC mit Extrakten (75 µl) aus unbehandelten, stabil transfizierten U373-CAT-Zellen und kokultivierten U373-CAT/VP16-Zellen (-), sowie PEG-fusionierten (+ PEG) oder HCMV-infizierten U373-CAT/VP16-Zellen (+ HCMV).

Um zu zeigen, dass die nachgewiesene Zell-Zell-Fusion tatsächlich durch HCMV induziert wird, wurden anschließend ankonzentrierte Virionen aus zellfreien Virusüberständen, wie unter 4.3.3.3 beschrieben, durch Ultrazentrifugation sedimentiert und im Fusions-Assay untersucht. Als Kontrolle diente der ultrazentrifugierte virusfreie Kulturüberstand. Zur Virus-Adsorption wurden 1×10^6 kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen entweder mit 500 µl Kulturmedium ohne FCS, 500 µl ultrazentrifugiertem Kulturüberstand oder 500 µl sedimentierten, 1:5 in Kulturmedium ohne FCS resuspendierten Virionen für 1 h bei RT inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen und die Zellen in Kulturmedium für 24 h bei 37 °C weiter inkubiert, bevor die Zellen in 150 µl Lysispuffer lysiert wurden. Je 75 µl der Zellextrakte wurden mittels CAT-Assay auf CAT-Expression analysiert.

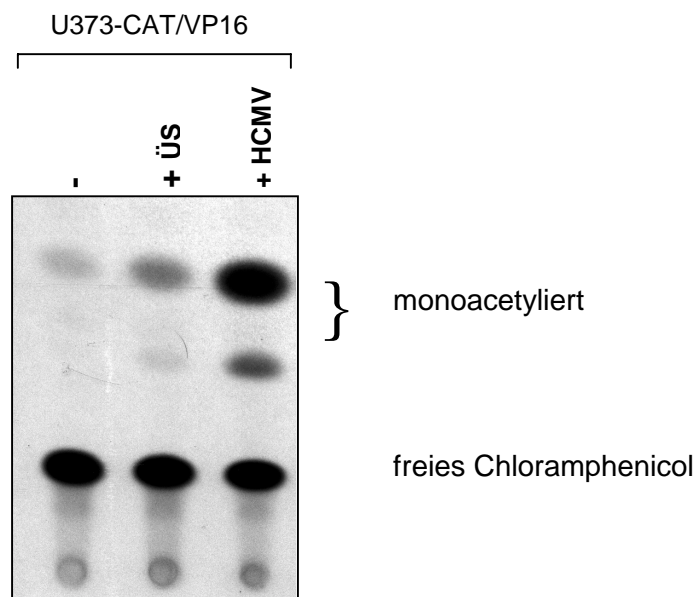


Abb.18 CAT-Expression nach Zell-Zell-Fusion durch sedimentierte HCMV-Virionen

Autoradiographie der acetylierten Produkte nach CAT-Assay und DC mit Extrakten aus unbehandelten, stabil transfizierten kokultivierten U373-CAT/VP16-Zellen (-), aus mit ultrazentrifugiertem Kulturüberstand behandelten (+ ÜS) oder mit sedimentierten Virionen infizierten U373-CAT/VP16-Zellen (+ HCMV).

Im Fusions-Assay wurde eine deutliche Induktion der CAT-Expression nach Inkubation mit ankonzentrierten Virionen beobachtet (Abb.18). Für die kokultivierten U373-VP16/CAT konnte geringe CAT-Aktivität nachgewiesen werden, die als spontane Fusion der Zellen interpretiert wurde, während für den ultrazentrifugierten Zellkulturüberstand geringfügig stärkere Signale erhalten wurden.

Diese Ergebnisse im Fusions-Assay ließen vermuten, dass die ermittelte CAT-Aktivität die Folge einer HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion ist, die durch die in der viralen Hüllmembran integrierten Glykoproteine induziert wird.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass HCMV-spezifische Transaktivatoren, die früh nach Infektion (12-24 h) exprimiert werden, zu einer Transkriptionsaktivierung des CAT-Gens führen könnten. Daher wurden U373-CAT-Zellen allein mit einer moi von 1,0 mit HCMV infiziert und 24 h nach Infektion auf CAT-Expression untersucht. Das erhaltene Signal entsprach in etwa dem Signal für die kokultivierten Zellen (s. Abb.19A, Spur 1).

Die im Fusions-Assay ermittelte CAT-Expression im HCMV-Ansatz wurde somit als Folge der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion, die zur Transkriptionsaktivierung des CAT-Gens durch den Transaktivator GAL4-VP16 führte, gewertet.

5.1.5 Quantifizierung von HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusionen

Nachdem gezeigt wurde, dass mit Hilfe des etablierten Fusionsassays Zell-Zell-Fusionen spezifisch nachgewiesen werden konnten, wurde überprüft, ob quantitative Aussagen bezüglich des Ausmaßes der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion ermittelt werden können. Dazu wurden 1×10^6 U373-CAT/VP16-Zellen kokultiviert und mit unterschiedlichen moi von 0,006-3,0 mit zellfreien Virusüberständen, wie unter 4.3.3.2 beschrieben, infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen in 150 μ l Lysispuffer lysiert und je 18 μ l der Zellextrakte mittels CAT-Assay analysiert. Die Auswertung der CAT-Expression erfolgte nach einstündiger Exposition der DC-Platten mittels eines Bio Imager BAS 1000 und der Software TINA4.0. Für die Quantifizierung der CAT-Expression wurden die Werte an monoacetyliertem Chloramphenicol ermittelt, auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität bezogen (% monoacetyliertes Chloramphenicol) und graphisch dargestellt.

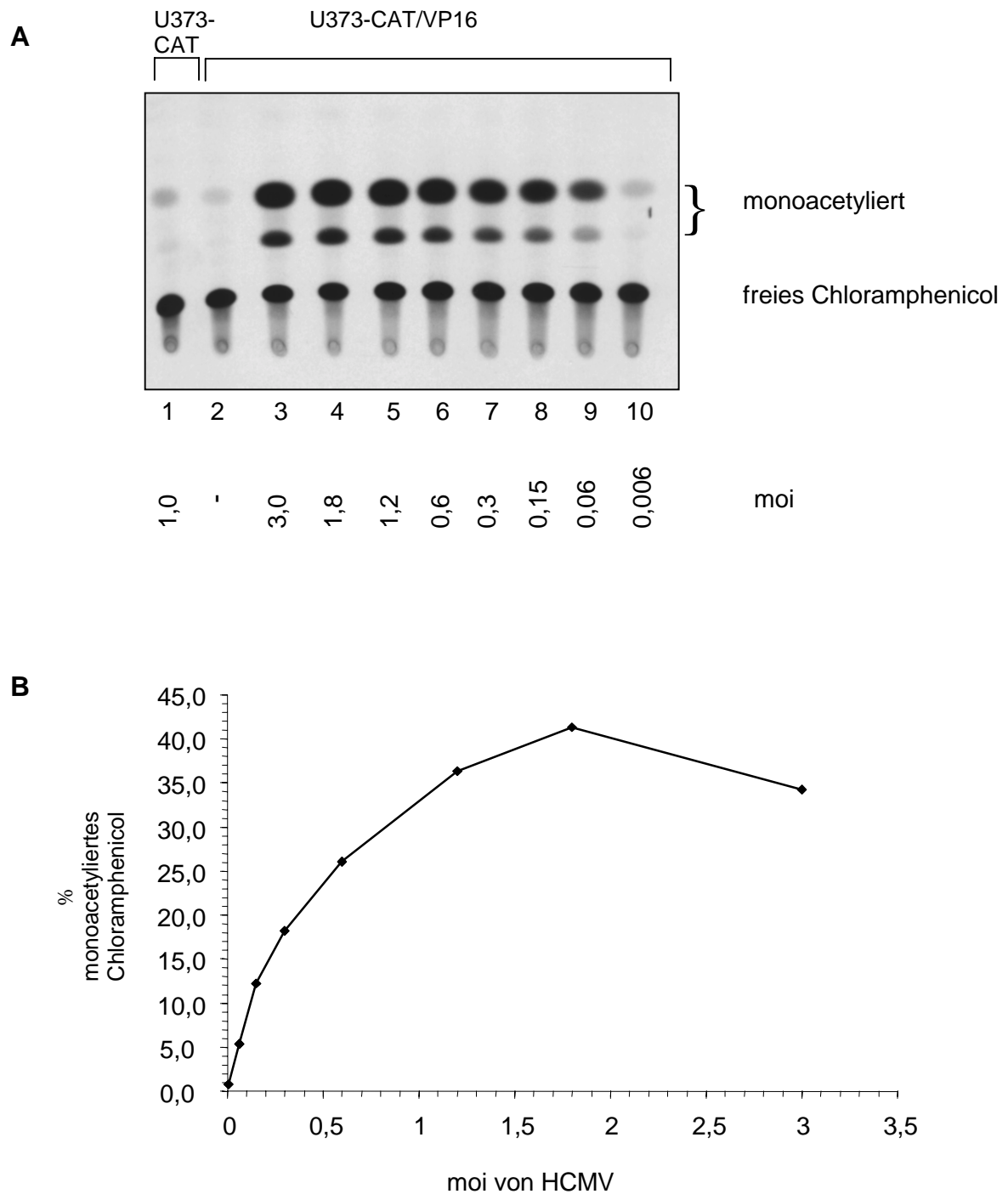


Abb. 19 A, B Quantifizierung HCMV-induzierter Zell-Zell-Fusion

(A) Autoradiographie nach CAT-Assay und DC von Extrakten aus HCMV-infizierten (moi=1,0) U373-CAT-Zellen (Spur 1), unbehandelten U373-CAT/VP16-Zellen (Spur 2) und mit HCMV-infizierten (moi= 3,0-0,006) U373-CAT/VP16-Zellen (Spuren 3-10).

(B) Graphische Darstellung der HCMV-induzierten Zell-Zell-Fusion in Abhängigkeit der eingesetzten moi. Die Abszisse kennzeichnet die Multiplizität der eingesetzten infektiösen Einheiten (moi), die Ordinate die % an monoacetyliertem Chloramphenicol (CAMP).

Die Abb.19 A, B zeigen, dass die eingesetzte moi direkt mit einem Anstieg an Fusionsereignissen und somit mit der Induktion der CAT-Expression korrelierte. Maximale CAT-Aktivität wurde bei diesem Versuchsansatz bei einer moi von 2,0 erreicht, während CAT-Aktivitäten bei einer sehr geringen moi von etwa 0,1 noch nachweisbar waren. Die Abnahme an CAT-Aktivität bei höherer moi wurde auf eine etwaige ausgeprägte Cytopathogenität bzw. auf Cytotoxizität des Virus-Inokulums zurückgeführt.

Der CAT-Reporter-Gen-Aktivierungs-Assay stellt somit eine neue, sensitive Methode dar, um HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusionen spezifisch nachzuweisen und zu quantifizieren.

5.1.6 Identifizierung der am Fusionsvorgang beteiligten Glykoproteine

Aus der Literatur geht hervor, dass solitär exprimiertes Glykoprotein B bzw. stabil transfiziertes gB schwache Fusionsaktivität besitzt (Navarro *et al.*, 1993; Bold *et al.*, 1996). Diese Daten wurden mit Hilfe der klassischen Fusionsuntersuchungen gewonnen. Ebenso wird für das Glykoprotein H angenommen, dass es über Fusionsaktivität verfügt (Milne *et al.*, 1998).

Die am Fusionsvorgang des HCMV beteiligten Glykoproteine wurden bislang jedoch nur unzureichend untersucht. Mit Hilfe des etablierten Fusions-Assays sollte untersucht werden, welche Glykoproteine am Fusionsvorgang des HCMV beteiligt sind. Die Untersuchung solitär exprimierter Glykoproteine im Fusions-Assay setzt die korrekte Prozessierung und den Transport der Proteine zur Zelloberfläche voraus. Sowohl mittels stabil exprimierender Zelllinien, als auch anhand infizierter Zellen konnte die korrekte Prozessierung von HCMV-Glykoproteinen in U373-Zellen nachgewiesen werden (Kari *et al.*, 1992; Reis *et al.*, 1993).

Für die Untersuchung transient exprimierter Glykoproteine mittels Fusions-Assay wurden in Analogie zu transienten Fusions-Assays im Herpes Simplex Virus-System, die Glykoproteine B, H und L ausgewählt.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten für das HCMV-gB eine relativ geringe Oberflächenexposition, so dass ein chimäres gB-Konstrukt, bei dem der cytoplasmatische Anteil durch den des Vesicular-Stomatitis-Virus Glykoproteins G (VSV-G) ersetzt wurde (s. 5.1.6.1), hergestellt und mit in die Untersuchungen einbezogen wurde. Des weiteren wurde das Glykoprotein L des HCMV, über dessen solitäre Expression bislang keine Daten vorliegen, kloniert und exprimiert (s. 5.1.6.3).

Der korrekte Transport der Glykoproteine zur Zelloberfläche wurde mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz in U373-CAT bzw. U373-VP16-Zellen überprüft. Der Oberflächen-Transport des Glykoprotein H setzt dabei die Coexpression des Glykoprotein L voraus, so dass die Untersuchung der Glykoproteine H und L nur nach Cotransfektion der entsprechenden Konstrukte möglich war. Um festzustellen, ob die Expression eines einzelnen Glykoproteins für die Zell-Zell-Fusion hinreichend ist, wurden diese entweder in der Reporter-gen-Zelllinie (U373-CAT) oder in der Transaktivator-Zelllinie (U373-VP16) transient exprimiert und anschließend mit der entsprechenden Akzeptor-Zelllinie kokultiviert. Die Zellen wurden 72-96 h nach Transfektion geerntet und mittels CAT-Assay auf Reporter-Gen-Aktivierung untersucht.

5.1.6.1 Herstellung des eukaryotischen Expressionskonstruktes pRc/CMV-gB-VSV-G

Um die mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz bestimmte Oberflächen-Exposition des Glykoprotein B zu erhöhen, wurde ein chimäres gB-Konstrukt (pRc/CMV-gB-VSV-G) (Abb. 20) durch rekombinante PCR, wie unter 4.1.9.3 beschrieben, hergestellt. Dabei wurde die Sequenz des cytoplasmatischen Anteils des gB durch die des VSV-G-Proteins ersetzt. Für die Amplifikation des gB-Fragments wurde das Vektorkonstrukt pRc/CMV-gB (s. 3.14.4) als Matrize und die Oligonukleotide gBf und gBr, für die Amplifikation des VSV-G-Fragments das Vektorkonstrukt pBlue-VSV-G (s. 3.14.8) und die Oligonukleotide VSV-Gf und VSV-Gr (s. 3.15.2) verwendet. Die erhaltenen DNA-Fragmente von 978 bp (gB) und 92 bp (VSV-G) wurden nach Aufreinigung (s. 4.1.9.2) für die nachfolgende PCR mit den Oligonukleotiden gBf und VSV-Gr als Matrizen eingesetzt. Das 1070 bp große Amplifikat wurde gereinigt und in den Vektor pGEM[®]-T (s. 3.14.9) kloniert.

Die Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienklonen wurde mittels Restriktion (s. 4.1.3) und Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.5) auf Insertion des 1070 bp großen DNA-Fragments überprüft. Die Sequenz des klonierten DNA-Fragments wurde mittels Sequenzierung mit dem Oligonukleotiden T7 und Sp6 (s. 3.15.1) auf Substitutionen überprüft. Die Sequenz enthielt keine Mutationen, so dass das Konstrukt pGEM-T-gB-VSV-G in *E. Coli* SSC110-Zellen (s. 3.13.4) transformiert wurde. Das 1070 bp große DNA-Fragment wurde mittels ClaI- und XbaI-Restriktion in das Vektorkonstrukt pRc/CMV-gB, das zuvor durch Restriktion mit ClaI und XbaI geschnitten worden war, subkloniert. Die Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienklonen wurde mittels Restriktion und anschließender Agarosegelelektrophorese auf Insertion des chimären DNA-Fragments überprüft.

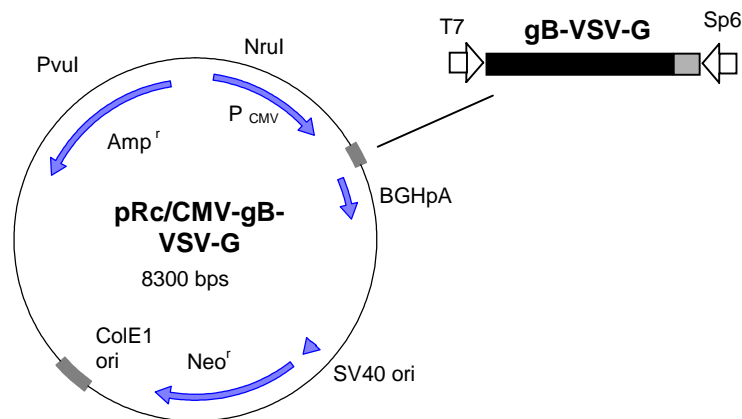


Abb. 20 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionskonstruktes pRc/CMV-gB-VSV-G

Dargestellt ist der Vektor pRc/CMV mit ColE1 und SV40 ori, dem Neomycinresistenz-Gen (Neo^r), dem β -Laktamase-Gen (Amp^r), der BGH-Polyadenylierungsstelle (BGHpA), dem CMV-Promotor (P_{CMV}), sowie das klonierte chimäre DNA-Fragment gB-VGV-G, das von den Promotoren T7 und Sp6 flankiert wird.

Das Konstrukt pRc/CMV-gB-VSV-G wurde in eukaryotische Zellen transfiziert und die Expression des gB-Proteins mit cytoplasmatischem VSV-G-Anteil mit einem monoklonalen Anti-VSV-G-Antikörper überprüft. Der Nachweis des korrekten Oberflächen-Transports des gB-VSV-G erfolgte mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz.

5.1.6.2 Fluoreszenz-immunologische Darstellung von gB und gB-VSV-G in U373-Zellen nach transienter Expression

Zur Analyse der Oberflächen-Expression von solitär exprimiertem gB im Vergleich zu der des gB mit cytoplasmatischem Anteil des VSV-G, wurden U373-Zellen mit dem Konstrukt pRc/CMV-gB oder pRc/CMV-gB-VSV-G wie unter 4.3.6 beschrieben transfiziert und 48 h nach Transfektion mittels Paraformaldehyd fixiert. Die indirekte Immunfluoreszenz (s. 4.5.2) erfolgte unter Verwendung des monoklonalen gB-spezifischen Antikörpers 27-156 und Anti-Maus-FITC-konjugierter F(ab')₂-Fragmente (1:50 in 3%-BSA-Lösung). Für das gB mit dem cytoplasmatischen Anteil des VSV-G konnte mittels Immunfluoreszenz eine um ca. 50% gesteigerte Oberflächen-Exposition nachgewiesen werden (Abb. 21).

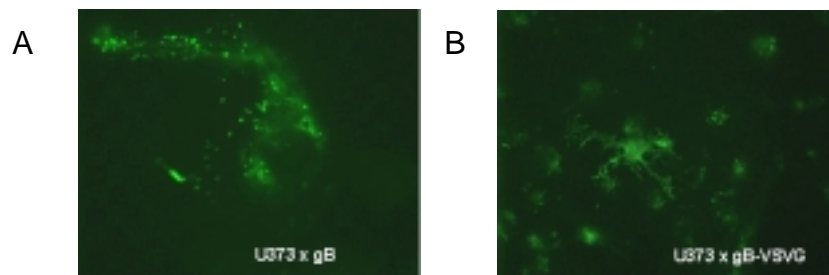


Abb.21 Darstellung der Oberflächen-Expression des gB und des gB-VSV-G nach transienter Transfektion von U373-Zellen mit den Konstrukten pRc/CMV-gB und pRc/CMV-gB-VSV-G.

(A) Oberflächen-Immunfluoreszenz des gB nach Inkubation mit dem Anti-gB AK 27-156 und Anti-Maus FITC-konjugierten F(ab')₂-Fragmenten. (B) Oberflächen-Immunfluoreszenz des gB-VSV-G nach Inkubation mit den o.g. AK.

5.1.6.3 Herstellung des eukaryotischen Expressionskonstruktes pcDNA3.1-gL-Myc/His

Zur Herstellung des Konstruktes pcDNA3.1-gL-Myc/His (Abb.22) wurde der offene Leserahmen des Glykoprotein L (gL; UL115) mit den Oligonukleotiden gLf und gLr (s. 3.15.2) aus viraler DNA mit Hilfe des „Advantage™ Genomic PCR Kit“ (s. 4.1.9.1) amplifiziert. Das 900 bp große Amplifikat wurde mittels BamHI und HindIII-Restriktion geschnitten und in den Vektor pcDNA3.1 Myc/His (s. 3.14.5), der zuvor mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII linearisiert worden war, unter Erhalt des korrekten Leserasters der im Vektor enthaltenen Epitopsequenzen kloniert. Die Plasmid-DNA transformierter Bakterien-Klone wurden mittels Restriktion (s. 4.1.3) auf Insertion der gL-Sequenz überprüft. Die gL-Sequenz der Plasmid-DNA positiver Klone wurde durch Sequenzierung (s. 4.1.10) mit den Oligonukleotiden T7, BGHpolyA und gL648 (s. 3.15.1) analysiert und durch anschließenden Sequenzvergleich zur publizierten Sequenz (Chee *et al.*, 1990) überprüft. Die analysierte Sequenz enthielt keine Mutationen.

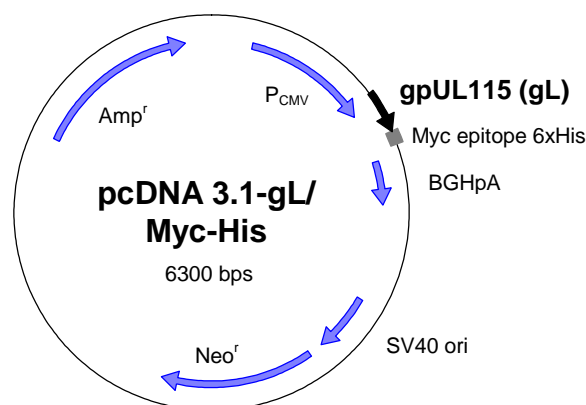


Abb. 22 Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionskonstruktes pcDNA 3.1-gL/Myc-His

Dargestellt sind der SV40 ori, der CMV-Promotor (P_{CMV}), das β -Laktamase-Gen (Amp^r), die BGH-Polyadenylierungsstelle (BGHpA), sowie der klonierte Leserahmen UL115 (gpUL115) mit dem „Myc-His“-Epitop (Myc epitope 6x His).

Nach Transfektion des Konstruktes pcDNA3.1-gL/Myc-His in eukaryotische Zellen wird ein gL-Protein mit einem C-terminalen „Myc-His“-Epitop exprimiert (gL/Myc-His), das mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Myc- oder Anti-His-Antikörpers spezifisch detektiert werden kann.

5.1.6.4 Fluoreszenz-immunologische Darstellung von gL/Myc-His in Cos7- und U373-Zellen nach transienter Expression

Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von solitär exprimiertem gL/Myc-His wurde das Konstrukt pcDNA3.1-gL/Myc-His mittels Lipofectin-Transfektion (s. 4.3.6) in Cos7- und U373-Zellen transfiziert. Als Kontrollen dienten Transfektionen des Konstruktes pRc/CMV-gH, sowie die Klonierungs-Ausgangsvektoren pcDNA3.1/Myc-His und pRc/CMV. Der Nachweis der Expression des gL/Myc-His erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (s. 4.5.2). Dazu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit Aceton/Methanol fixiert (s. 4.5.2.1) und zum fluoreszenz-immunologischen Nachweis mit dem His-spezifischen Antikörper (1:100 in 3% BSA-Lösung) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden Anti-Maus-FITC-konjugierte F(ab')₂-Fragmente (1:50 in 3%-BSA-Lösung) verwendet.

Die fluoreszenz-mikroskopische Auswertung ergab, dass das Epitop-markierte gL/Myc-His solitär exprimiert werden kann. Die subzelluläre vesikuläre Verteilung deutete auf eine Lokalisation im ER hin, die den Erwartungen bezüglich der Lokalisation eines nicht-membranverankerten Glykoproteins entsprachen (Abb. 23).

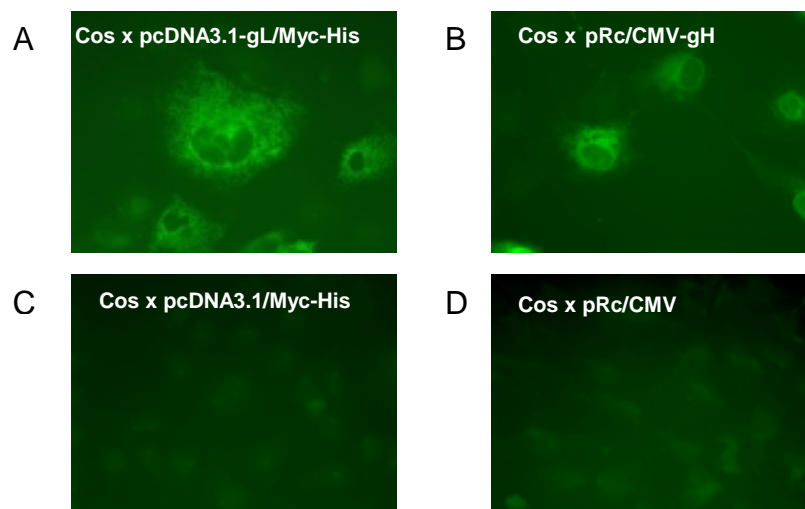


Abb.23 Darstellung der Expression des gL/Myc-His und des gH nach transienter Transfektion von pcDNA3.1-gL/Myc-His oder pRc/CMV-gH in Cos7-Zellen.

Fluoreszenz-immunologische Darstellung des (A) gL/Myc-His unter Verwendung des Anti-His-spezifischen Antikörpers und Anti-Maus FITC-konjugierten F(ab')₂-Fragmenten, (B) gH unter Verwendung des polyklonalen Anti-gH-AK und Anti-humanen FITC-konjugierten F(ab')₂-Fragmenten. (C+D) Darstellung der Fluoreszenzsignale nach Transfektion der Kontroll-DNA (C) pcDNA3.1/Myc-His und (D) pRc/CMV nach Inkubation mit den oben genannten Antikörpern.

5.1.6.5 Überprüfung der Chaperone-Funktion von gL/Myc-His in Cos7- und U373-Zellen nach transients Cotransfektion mit pRc/CMV-gH

Die Funktion des Glykoprotein L, als Chaperone den Transport des Glykoproteins H zur Zell-Oberfläche zu ermöglichen, wurde nach Coexpression der Glykoproteine H und L/Myc-His mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz untersucht. Nach Cotransfektion (s. 4.3.6.) der Konstrukte pRc/CMV-gH und pcDNA3.1-gL/Myc-His in Cos7- und U373-Zellen wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mittels Paraformaldehyd fixiert. Die indirekte Immunfluoreszenz (s. 4.5.2) erfolgte unter Verwendung des polyklonalen gH-spezifischen Antikörpers (pab-gH). Als Zweitantikörper wurden Anti-Human-FITC-konjugierte F(ab')₂-Fragmente (1:50 in 3%-BSA-Lösung) verwendet. Als Kontrollen wurden die Konstrukte und der Ausgangsvektor pcDNA3.1/Myc-His solitär transfiziert und auf gL- bzw. gH-Oberflächen-Expression untersucht. Zudem wurde die Cotransfektionen in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Colokalisation des gH und des gL analysiert. Dazu wurde eine Doppel-Färbung mit dem humanen gH-AK pab-gH und dem Maus Anti-His-AK (1:100 in 3% BSA-Lösung), sowie dem FITC-konjugierten Anti-Human (1:50) und dem Alexa Fluor™ 594 AK (1:500) als Zweitantikörper, durchgeführt.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte die Chaperone-Funktion des gL/Myc-His bestätigt werden. Die Cotransfektion der Konstrukte pcDNA3.1-gL/Myc-His und pRc/CMV-gH führte zu transfizierten Zellen, die die Glykoproteine gL/Myc-His und gH coexprimierten. Die Lokalisation des gL/Myc-His war im Vergleich zu solitär exprimiertem gL verändert und konnte vor allem im Golgi nachgewiesen werden (Abb. 24).

Nach gH/gL Coexpression konnte das gH an der Zell-Oberfläche detektiert werden, während für solitär exprimiertes gH, gL, sowie für die Kontrolle pcDNA3.1/Myc-His keine Oberflächen-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 25).

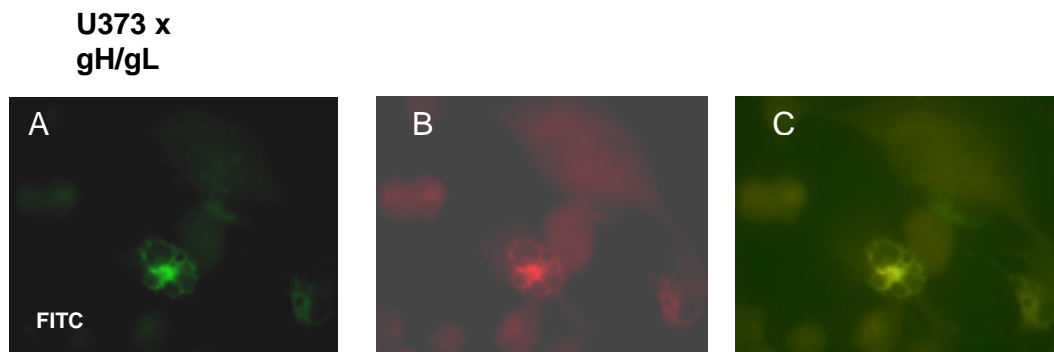


Abb. 24 Colokalisation von gH und gL/Myc-His nach Cotransfektion der Konstrukte pcDNA3.1-gL/Myc-His und pRc/CMV-gH in U373-Zellen.

(A) Fluoreszenz-immunologische Darstellung des gH nach Inkubation mit dem polyklonalen Anti-gH-AK und Anti-humanen FITC-konjugierten $F(ab')_2$ -Fragmenten. (B) Darstellung der intrazellulären Verteilung des gL/Myc-His nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-His-AK und des Anti-Maus Alexa Fluor™ 594 Zweitantikörpers. (C) Darstellung der Colokalisation des gL/Myc-His und gH nach Überlagerung der Fluoreszenzen.

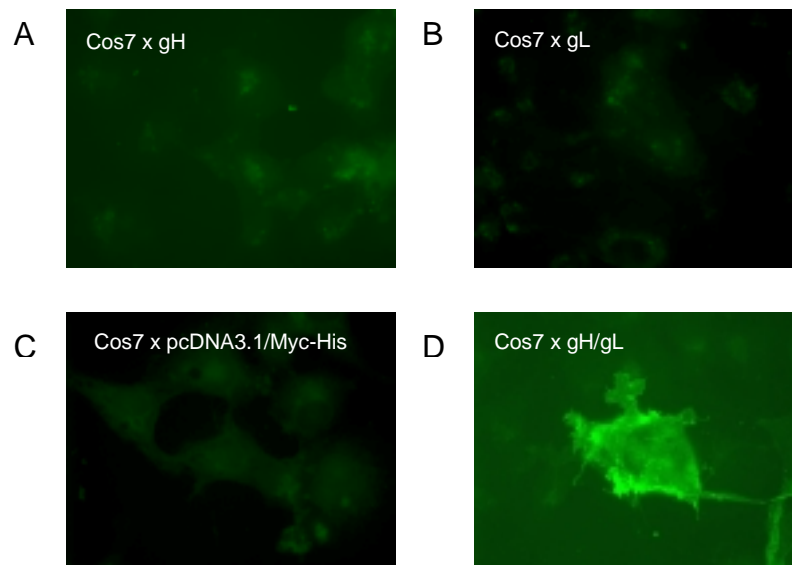


Abb. 25 Darstellung der gH und gL/Myc-His Oberflächenexposition nach transienter solitärer oder Cotransfektion von Cos7-Zellen mit den Konstrukten pcDNA3.1-gL/Myc-His und pRc/CMV-gH.

(A) Oberflächen-Immunfluoreszenz des solitär exprimierten gH nach Inkubation mit dem polyklonalen Anti-gH-Antikörper und Anti-humanen FITC-konjugierten $F(ab')_2$ -Fragmente. (B) Oberflächen-Immunfluoreszenz des solitär exprimierten gL/Myc-His nach Inkubation mit dem monoklonalen Anti-His-AK und Anti-Maus FITC-konjugierten $F(ab')_2$ -Fragmenten. (C) Fluoreszenzsignale nach Transfektion der Kontroll-DNA pcDNA3.1/Myc-His. (D) Oberflächen-Immunfluoreszenz des gH nach gH/gL-Myc-His Coexpression und Inkubation mit dem polyklonalen Anti-gH-Antikörper und Anti-humanen FITC-konjugierten $F(ab')_2$ -Fragmenten.

5.1.7 Untersuchung transient exprimierter Glykoproteine im Fusions-Assay

Zur Untersuchung der transient transfizierten Glykoproteine gB und gH/gL im Fusions-Assay wurden U373-CAT-Zellen in 6-Well-Kulturplatten mittels Lipofectin-Transfektion (s. 4.3.6) mit den Konstrukten pRc/CMV-gB (s. 3.14.4), oder pRc/CMV-gH (s. 3.14.6) und pcDNA3.1-gL/Myc-His transfiziert und 24 h nach Transfektion mit U373-VP16-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden mit Vektor (pRc/CMV) transfizierte Zellen (Negativkontrolle) und kokultivierte, nicht-transfizierte Zellen, sowie mittels HCMV fusionierte kokultivierte Zellen (Positivkontrolle) verwendet. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen in 150 µl Lysispuffer geerntet und auf CAT-Expression untersucht.

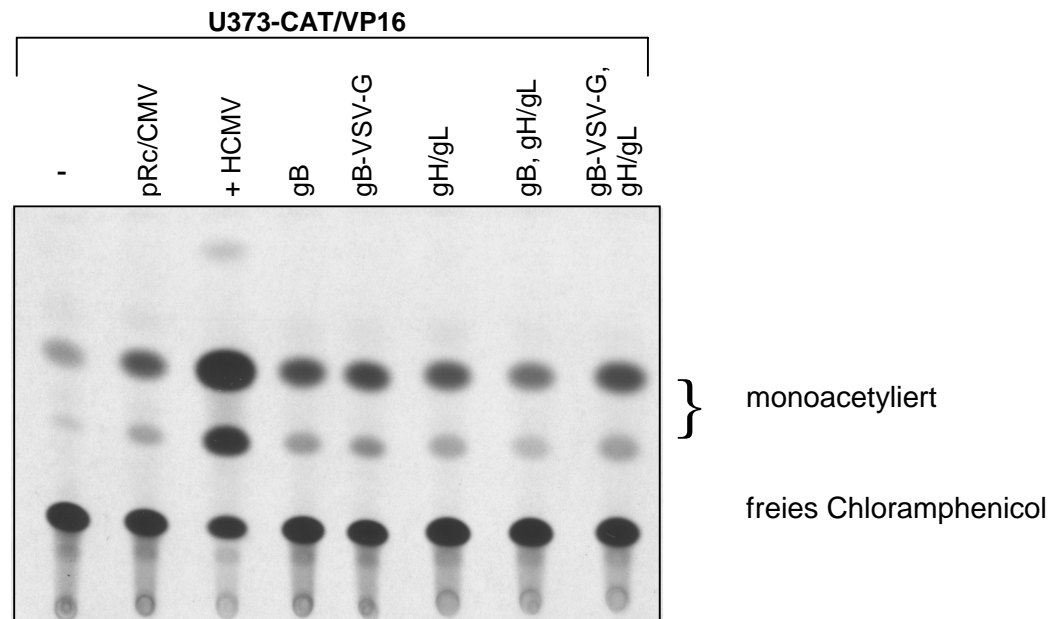
Für das Glykoprotein B sowie für die Glykoproteine H/L konnte im Fusions-Assay keine Fusionsaktivität nachgewiesen werden. Die gemessene CAT-Expression entsprach der der Negativkontrolle (pRc/CMV), die durch eine Zell-Zell-Fusion des Transfektions-Reagens Lipofectin verursacht wurde.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Zell-Zell-Fusion zu erhöhen, wurden alternativ bereits kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen mit den oben genannten Konstrukten transfiziert und mittels Fusions-Assay auf CAT-Expression untersucht. Auch hier konnte weder für das Glykoprotein B, noch die Glykoproteine H/L Fusionsaktivität nachgewiesen werden (Abb. 26 A).

5.1.8 Untersuchung coexprimierter Glykoproteine im Fusions-Assay

Da für die transienten Expressionen des gB und des gH/gL im Fusions-Assay keine messbare Zell-Zell-Fusion nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob die Zell-Zell-Fusion durch Coexpression der drei Glykoproteine induziert werden kann. Dazu wurden kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen mit den Konstrukten pRc/CMV-gB, pRc/CMV-gH und pcDNA3.1-gL/Myc-His, wie unter 4.3.6 beschrieben, cotransfiziert. Als Kontrollen wurden die unter 5.1.7 beschriebenen Ansätze verwendet. Zudem wurde das Konstrukt pRc/CMV-gB-VSV-G (s. 5.1.6.2), das eine gesteigerte Oberflächen-Exposition des gB zeigte (s. 5.1.6.5), in die Untersuchung mit einbezogen. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion geerntet und mittels CAT-Assay analysiert. Zur graphischen Auswertung der Daten wurden die ermittelten Werte um den Wert der Negativkontrolle (pRc/CMV) bereinigt (s. Abb. 26 B).

A



B

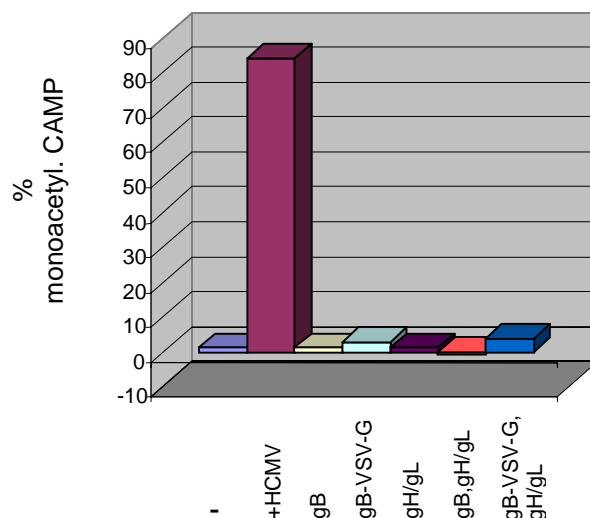


Abb. 26 A, B CAT-Expression nach Expression oder Coexpression der Glykoproteine B, H/L und gB-VSV-G

(A) Autoradiographie nach CAT-Assay und DC von Extrakten aus unbehandelten U373-CAT/VP16-Zellen (-), mit Vektor transfizierten (pRc/CMV), oder mit HCMV moi=1,0 infizieren U373-CAT/VP16-Zellen (+HCMV) und von U373-CAT/VP16-Zellen, die mit den Konstrukten pRc/CMV-gB oder pRc/CMV-gB-VSV-G (gB; gB-VSV-G), oder mit den Konstrukten pRc/CMV-gH und pcDNA3.1-gL/Myc-His (gH/gL) cotransfiziert wurden, sowie zudem mit dem Konstrukt pRc/CMV-gB (gB, gH/gL) oder pRc/CMV-gB-VSV-G (gB-VSV-G, gH/gL) cotransfiziert waren. Es wurde je 75 µl Zellextrakt eingesetzt.

(B) Graphische Auswertung der CAT-Expression (% monoacetyliertes Chloramphenicol) nach solitärer und Coexpression von gB, gB-VSV-G und gH/gL.

Auch die Coexpression der Glykoproteine B, H/L und gB-VSV-G, gH/gL in U373-CAT/VP16-Zellen führte im Vergleich zu HCMV-Virionen nicht zu einer eindeutigen Induktion der Zell-Zell-Fusion (Abb. 26 A, B).

5.2 Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion mit glykoproteinspezifischen Antikörpern

Da die am Fusionsvorgang des HCMV beteiligten Glykoproteine durch transiente Coexpression mittels Fusions-Assay nicht identifiziert werden konnten, wurde in den folgenden Untersuchungen eine indirekte Nachweismethode angewendet. Es wurde geprüft, ob durch monoklonale glykoprotein-spezifische Antikörper die virusinduzierte Zell-Zell-Fusion inhibiert werden kann. Zur Verfügung standen mono- und polyklonale Anti-gB und Anti-gH Antikörper, die mittels Fusions-Assay auf Fusionsinhibierung analysiert wurden.

5.2.1 Modifizierung des Fusions-Assays zur Untersuchung der Fusionsinhibierung

Um die optimale Inkubationsdauer für Virussuspension und Antikörper-Lösung zu bestimmen, wurden in Vorversuchen zellfreie Virusüberstände für 1, 3 und 6 h bei 37°C inkubiert und anschließend im Fusions-Assay eingesetzt. Als Kontrollen wurde Virus, welches nicht vorinkubiert wurde (0 h), sowie als interne Assay-Kontrolle kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen (-) verwendet. Die bei 37°C vorinkubierten Viren wurden anschließend für 1 h bei RT an konfluente U373-CAT/VP16-Zellen adsorbiert (moi=0,5). 48 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mittels CAT-Assay auf CAT-Expression untersucht. Die Auswertung der CAT-Expression erfolgte nach einstündiger Exposition der DC-Platten mittels des Bio Imager BAS 1000 und der Software TINA4.0.

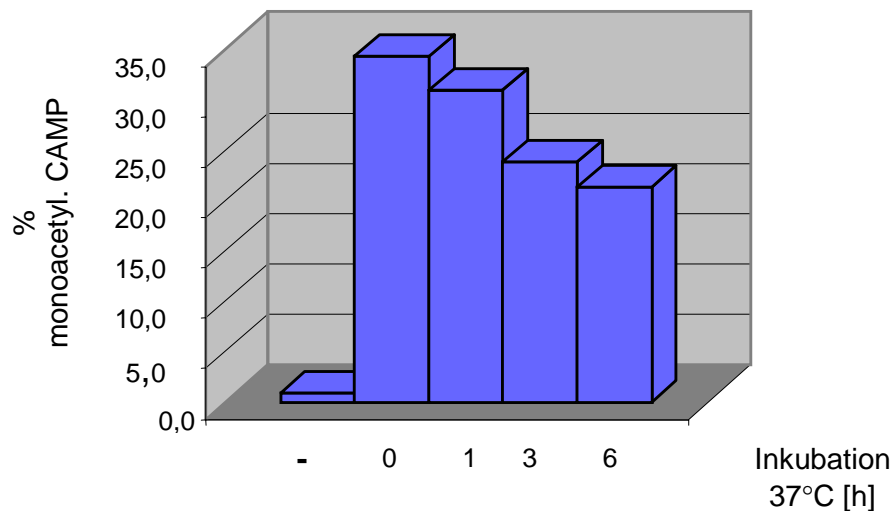


Abb. 27 Zeitkinetik der CAT-Expression nach Virus-Vorinkubation bei 37°C

Graphische Darstellung der HCMV-induzierten Zell-Zell-Fusion (% monoacetyliertes Chloramphenicol) in Abhängigkeit der Vorinkubationsdauer bei 37°C des eingesetzten Virus-Inokulums (h). Es wurden je 75 µl Zellextrakt aus unbehandelten U373-CAT/VP16-Zellen (-), oder aus U373-CAT/VP16-Zellen, die mit Virus infiziert wurden, welches bei 37°C für 0, 1, 3, 6 h, vorinkubiert worden war, eingesetzt.

Wie die Abb. 27 zeigt, nimmt die Fusogenität des HCMV in Abhängigkeit der Vorinkubationsdauer des Virus bei 37°C deutlich messbar ab. Nach 1 h Vorinkubation verringert sich die CAT-Aktivität um etwa 5%. Mit 30% CAT-Aktivität lag das Messergebnis jedoch im aussagefähigen Bereich, so dass die Inkubationsdauer von Virussuspension und Antikörper-Lösung für die folgenden Experimente auf eine Stunde festgelegt wurde.

Für die Inhibierungs-Experimente musste die Virussuspension mit der Antikörperlösung vorinkubiert werden, so dass sich das Gesamtvolumen des Infektionsmediums verdoppelte. Da die Effizienz der Virusadsorption mit steigendem Gesamtvolumen abnimmt, wurde für die folgenden Experimente eine geringere *moi* gewählt und das Gesamtvolumen des Infektionsmediums konstant gehalten. Um den Effekt der geringer eingesetzten *moi* auszugleichen, wurde die Kokultivierungsdauer der Zellen auf 48 h erhöht. Somit wurde gewährleistet, dass trotz geringerer *moi* CAT-Expression von über 30% gemessen werden konnte.

In Vorversuchen mittels PEG-Fusion konnte gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Fusion und somit die CAT-Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der Zellen gesteigert werden kann.

Die CAT-Expression nahm bis zu 72 h nach PEG-Fusion zu (Daten nicht gezeigt), so dass auch nach virusinduzierter Fusion und 48stündiger Kultivierungsdauer mit einer gesteigerten CAT-Expression gerechnet werden konnte.

5.2.1.1. Fusions-Assay unter Phosphonoessigsäure (PAA)

In Anbetracht der verlängerten Kokultivierungsdauer sollte ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse des Fusions-Assays durch die Neusynthese später Virusprodukte beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde der Effekt von PAA, das die virale DNA-Replikation und damit die Synthese später Proteine, z.B. der Glykoproteine, inhibiert, überprüft. Dazu wurden die kokultivierten Zellen nach erfolgter Virus-Adsorption mit 150 µg/ml PAA für 24, 36, 48 und 72 h nach Infektion kultiviert und auf CAT-Expression analysiert. Die ermittelte CAT-Aktivität unter PAA-Inkubation entsprach den ermittelten Werten ohne PAA-Behandlung, so dass ein Einfluss neusynthetisierter viraler Genprodukte auf die Zell-Zell-Fusion ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die gemessene Zell-Zell-Fusion wird demnach einzig durch die in der viralen Hüllmembran inserierten Glykoproteine induziert und ist unabhängig von der Neusynthese später viraler Genprodukte des HCMV.

5.2.2 Fusionsinhibierung durch Glykoprotein B- und H-spezifische Antikörper (AK)

Zur Untersuchung der Fusionsinhibierung durch gB- und gH-spezifische Antikörper mittels Fusions-Assay wurden gleiche Volumina von Virussuspension und Antikörper-Lösung bei 37°C für 1 h vorinkubiert. Es wurden zwei monoklonale gB-spezifische Antikörper (mab 27-156 und mab 58-15-18) und ein polyklonaler gH-spezifischer Antikörper (pab-gH) eingesetzt. Der Antikörper 58-15-18 diente als Kontrollantikörper, da er das Epitop AD3 erkennt, welches im cytoplasmatischen Anteil des Typ-I-Transmembranproteins lokalisiert ist, und deshalb keine fusionsinhibierende Wirkung haben sollte. Als positive Fusionskontrolle wurde Virus, welches ohne AK vorinkubiert wurde, verwendet.

1×10^6 konfluente U373-CAT/VP16-Zellen wurden für 1 h bei RT mit den Virus-Antikörper-Lösungen inkubiert, 48 h nach Infektion in 150 μ l Lysispuffer geerntet und mittels CAT-Assay auf CAT-Expression analysiert. Die Auswertung der CAT-Expression erfolgte nach einstündiger Exposition der DC-Platten mittels des Bio Imager BAS 1000 und der Software TINA4.0.

Mit Hilfe des Fusions-Assay konnte Fusionsinhibierung durch glykoprotein-spezifische Antikörper gemessen werden. Der Kontrollantikörper 58-15-18 führte zu keiner Fusionsinhibierung, während der gB-spezifische Antikörper 27-156 die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion um etwa 30%, der polyklonale gH-spezifische Antikörper pab-gH die Fusion um etwa 60% inhibierte. Die Beteiligung der Glykoproteine B und H am Fusionsvorgang des HCMV konnte dadurch eindeutig bestätigt werden (Abb. 28).

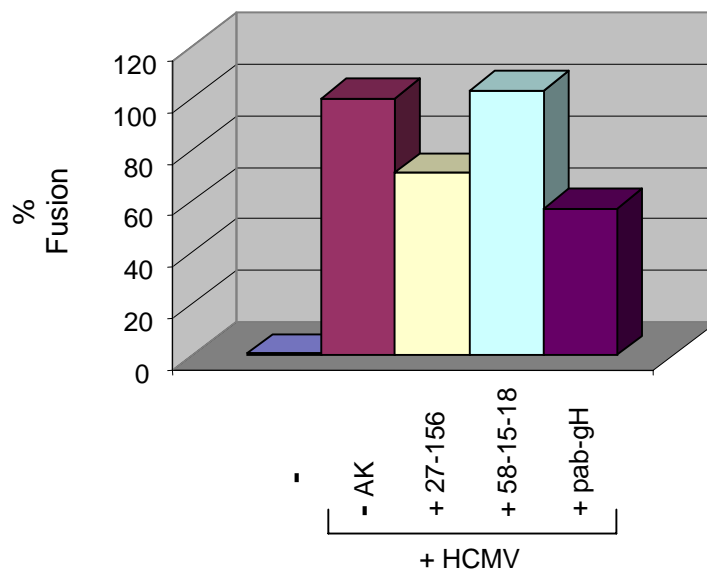


Abb. 28 Fusionsinhibierung durch gB- und gH-spezifische Antikörper

Graphische Darstellung der Fusionsinhibierung durch mAb 27-156 und pab-gH. Die ermittelten Werte (% Fusion) beziehen sich auf die Positivkontrolle, die mit 38%CAT-Aktivität auf 100 % Fusion gesetzt wurde (-AK). Als Assay-Kontrolle wurden nicht-infizierte, kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen (-) verwendet, als nicht-fusionsinhibierender Kontrollantikörper wurde der gB-spezifische AK 58-15-18 verwendet.

5.2.3 Fusionsinhibierung durch monoklonale humane gB-spezifische Antikörper

Um die Fusionseigenschaften des Glykoprotein B näher zu untersuchen, wurden monoklonale humane gB-spezifische Antikörper, die verschiedene Epitope des gB erkennen (Abb. 29), im Fusions-Assay eingesetzt. Die mittels Hybridoma-Technologie aus Monocyten HCMV-seropositiver Blutspender gewonnenen gB-spezifischen AK wurden freundlicherweise von Dr. Mats Ohlin, Lund Universität, Schweden zur Verfügung gestellt.

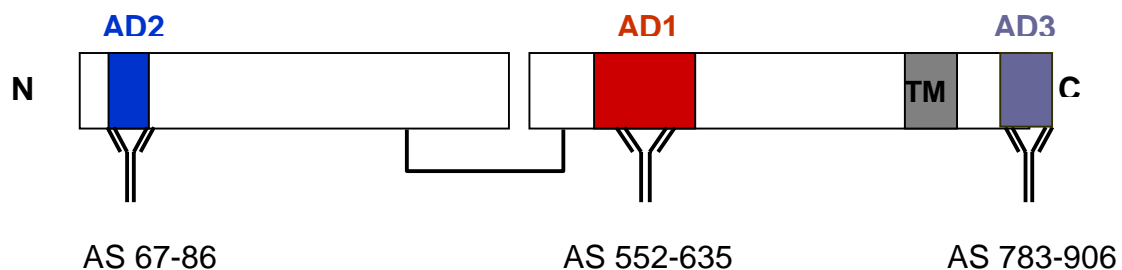


Abb. 29 Schematische Darstellung des gB mit Antikörperbindungsstellen

Dargestellt ist das gespaltene gB-Molekül aus N-terminalem und C-terminalem Spaltfragment. Die antigenen Domänen AD1, AD2 und AD3 sind hervorgehoben und ihre AS-Positionen sind gekennzeichnet.

Um die unterschiedlichen gB-Antikörper hinsichtlich ihrer fusionsinhibierenden Wirkung im Fusions-Assay miteinander vergleichen zu können, wurden die AK zunächst ankonzentriert und einer Konzentrationsbestimmung unterzogen. Zur AK-Konzentrierung wurden die Hybridoma-Überstände durch eine fraktionierte Ammonium-Sulfatfällung wie unter 4.5.3 beschrieben präzipitiert, in 0,1 VT PBS aufgenommen und gegen PBS dialysiert. Die gefällten IgG-Präparationen wurden mittels SDS-PAGE (s. 4.4.1) und Immunoblot (s. 4.5.1) analysiert. Der Nachweis der gefällten IgGs erfolgte mit einem HRP-konjugierten-Anti-Human-AK als Zweitantikörper (1: 5000). Der Großteil der IgG-Moleküle befand sich in der Fraktion nach der zweiten Fällung. Die schweren Ketten der IgGs konnten bei etwa 50 kDa nachgewiesen werden (Abb. 30).

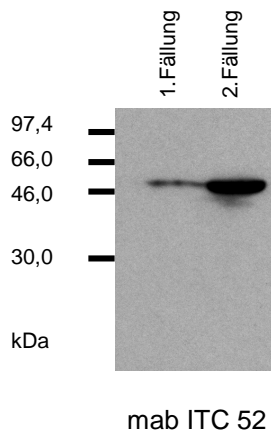


Abb. 30 Immunoblot Ammoniumsulfat-präzipitierter IgGs (mab ITC52) nach 12%iger SDS-PAGE

Aufgetragen wurden je 10 µl der 1. und 2. Fällung des mab ITC 52.

Die Überprüfung der Funktionalität der AK erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz (s. 4.5.2) an HCMV-infizierten HFF-Zellen. Die gefällten Antikörper wurden dazu 1:10-1:1000 in BSA-Lösung verdünnt. Parallel dazu wurden Verdünnungsreihen der nicht gefällten Ausgangs-Antikörper-Lösungen hergestellt. Als Zweitantikörper wurden FITC-konjugierte Anti-Human-IgG-F(ab')-Fragmente (1:50 in BSA-Lösung) verwendet.

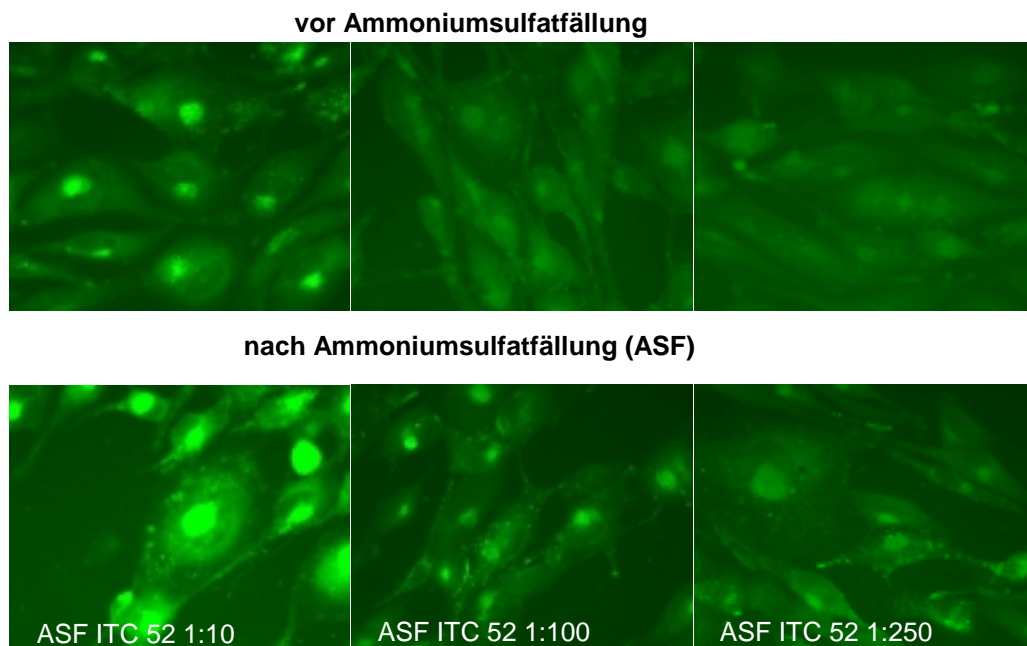


Abb.31 gB-spezifische Immunfluoreszenz HCMV-infizierter HFF-Zellen vor und nach ASF-Fällung des AK ITC52

Fluoreszenz-immunologische Darstellung der gB-Expression in HCMV-infizierten HFF-Zellen nach Inkubation mit dem Anti-gB-AK ITC52 vor und nach Fällung mit Ammoniumsulfat und unter Verwendung von Anti-humanen FITC-konjugierten F(ab')₂-Fragmenten als Zweitantikörper.

Die Funktionalität der gefällten Antikörper und die Ankonzentrierung um den Faktor 10-25 konnte durch die Immunfluoreszenz bestätigt werden.

5.2.1.1 Quantifizierung humaner gB-spezifischer Immunglobuline

Um die humanen gB-spezifischen AK im Fusions-Assay mit gleicher Quantität einsetzen zu können, wurde die Konzentration der gefällten IgGs mit Hilfe eines humanen IgG-Fc-ELISA (Messbereich 7-500 ng/ml) wie unter 4.5.4 beschrieben, bestimmt.

Dazu wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die gemittelten Werte anhand der erstellten Eichgerade abgelesen (Tab. 3).

Tabelle 3: IgG-Konzentration (µg/ml) der gefällten gB-AK
(Daten zur Virus-Neutralisation aus Ohlin et al., 1993).

Neutralisation	Antikörper	IgG-Konzentration [µg/ml]
-	ITC 33	14,6
-	ITC 39	142,2
+	ITC 48	40,5
+	ITC 52	27,0
(+)	ITC 63B	69,6
+	ITC 88	6,2
-	Mo58 (pp65)	27,7

5.2.4 **Fusionsinhibierung durch gB-spezifische Antikörper bei konstanter IgG-Konzentration**

Zur Untersuchung der Fusionsinhibierung durch humane gB-spezifische AK mittels Fusions-Assay wurden die unterschiedlichen AK auf eine Konzentration von 6,2 µg IgG/ml eingestellt. Die AK wurden dazu in DMEM Kulturmedium ohne FCS vorverdünnt, mit dem gleichen Volumenanteil an Virussuspension gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Als interne Assay-Kontrolle wurden kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen, die nicht infiziert wurden, verwendet.

Als positive „Fusionskontrolle“ diente Virus, welches ohne AK vorinkubiert wurde. Als Kontrollantikörper wurde der Antikörper Mo58, der das Tegumentprotein pp65 spezifisch erkennt und zu keiner Fusionsinhibierung führen sollte (Negativkontrolle), sowie ein HCMV-positives Humanserum, welches fusionsinhibierend sein sollte (Positivkontrolle), verwendet. Zur Erhöhung der Signifikanz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. 2×10^5 kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen wurden für 1 h bei RT mit den Virus-Antikörper-Lösungen inkubiert ($\text{moi} = 0,5$), 48 h nach Infektion in 50 μl Lysispuffer geerntet und mittels CAT-Assay auf CAT-Expression analysiert. Die Werte der Dreifachbestimmungen wurden gemittelt und graphisch dargestellt. Der ermittelte Wert (% monoacetyliertes Chloramphenicol) der positiven „Fusionskontrolle“ wurde mit 100% Fusion angegeben (Abb. 32).

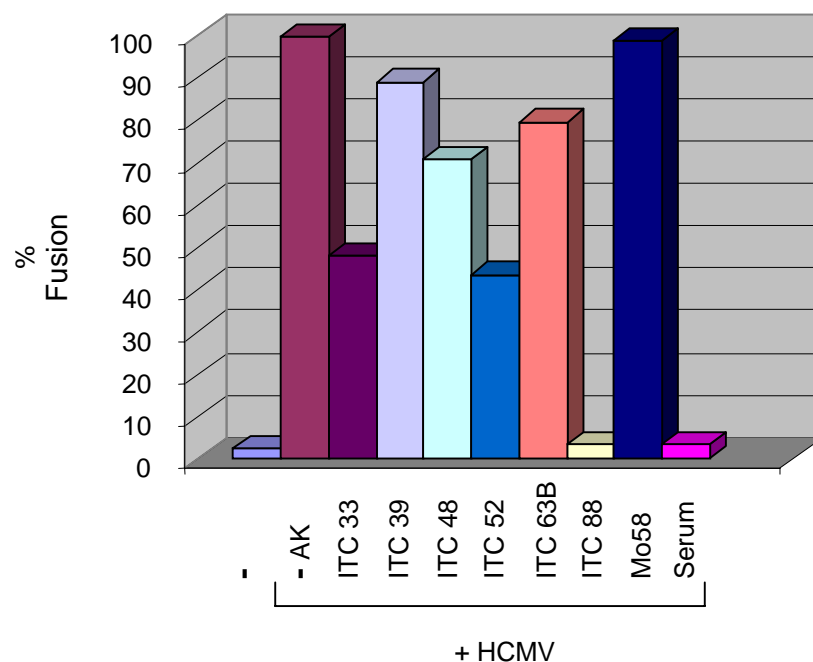


Abb. 32 Fusionsinhibierung durch gB-spezifische AK (6,2 μg IgG/ml)

Graphische Darstellung der Fusionsinhibierung durch monoklonale humane gB-AK: ITC 33, 39, 48, 52, 63B und 88. Die ermittelten Werte (% Fusion) beziehen sich auf die positive „Fusionskontrolle“, die auf 100 % Fusion gesetzt (-AK) wurde. Als Assay-Kontrolle wurden nicht-infizierte, kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen (-) verwendet, als nicht-fusionsinhibierender Kontrollantikörper wurde der pp65-spezifische-AK Mo58, als fusionsinhibierender Kontrollantikörper ein HCMV-positives Humanserum (Serum) verwendet.

Mit Hilfe des Fusions-Assay konnte, bei konstanter IgG-Konzentration, eine unterschiedlich starke Fusionsinhibierung für die gB-spezifischen Antikörper gemessen werden. Der pp65-spezifische Kontrollantikörper Mo58 zeigte keine fusionsinhibierende Wirkung, während das HCMV-positve Humanserum die Zell-Zell-Fusion um etwa 97% inhibierte.

Für die monoklonalen gB-spezifischen Antikörper konnte eine fusionsinhibierende Wirkung in folgender Reihenfolge festgestellt werden:

	ITC 88 > ITC 52 > ITC 33 > ITC 48			
% Fusionsinhibierung	95 %	60 %	50 %	30%

Der Antikörper ITC 63B wurde mit 20% fusionsinhibierender Wirkung als schwach inhibierend eingestuft, während die etwa 10%ige Fusionsinhibierung des Antikörpers ITC 39 als nicht fusionsinhibierend gewertet wurde.

5.3 Untersuchung zum Fusions-Mechanismus

Da der humane AD2-gB-spezifischer AK ITC 88 den komplexen Vorgang der HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion fast vollständig inhibierte, während die AD1-gB-spezifischen AK bei gleicher IgG-Konzentration nur 30-60% Inhibierung zeigten, stellte sich die Frage, ob die unterschiedlich starke Fusionsinhibierung der gB-AK durch Unterschiede im Mechanismus der Fusions-Inhibierung erklärt werden kann. Die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion setzt die Bindung („attachment“) des Virus an Membranproteinen bzw. Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) der Wirtszelle voraus. Durch die bisherigen Untersuchungen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bereits die initiale Bindung zwischen Virus und Zellmembran durch die gB-spezifischen AK inhibiert wurde. Mit Hilfe eines modifizierten „Attachment“-Assay sollte geprüft werden, welche Phase der Virus-Wirtszell-Interaktion durch Glykoprotein B-spezifische Antikörper beeinflusst wird.

5.3.1 Etablierung eines „Attachment“-Assays unter AK-Einfluss

Mit Hilfe des Attachment-Assays sollten HCMV-Virionen, die bei 4°C an Heparansulfat-Proteoglykanen der Plasmamembran der Wirtszelle binden, jedoch bei dieser Temperatur noch nicht fusionieren, nachgewiesen werden. Das Attachment kann dabei durch Heparin als kompetitiver Ligand HCMV-spezifischer Glykoproteine spezifisch inhibiert werden. Zur Untersuchung der initialen HCMV-Bindung an U73-CAT/VP16 Wirtszellmembranen wurden [³⁵S]-markierte Viruspräparationen verwendet, die wie unter 4.3.4 beschrieben hergestellt wurden. Der Einbau von [³⁵S]-Methionin/Cystein in Virus-Proteine wurde durch Szintillationsmessung bestimmt (s. 4.3.4.1). Die ermittelten Werte für 2 µl Virussuspension lagen in der Regel zwischen 120.000- 350.000 cpm. Zur Bestimmung der infektiösen Einheiten wurde die Virussuspension wie unter 4.3.3.1 angegeben titriert. Die Titer der [³⁵S]-markierten Viruspräparationen lagen zwischen 1 x 10⁶- 5 x 10⁶ i.E./ml. Um die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Fusions-Inhibierung durch gB-spezifische AK (s. 5.2.4) mit den Daten des „Attachment“-Assays unter AK-Einfluss vergleichen zu können, wurden die Zellen mit derselben moi von 0,5 inkubiert. Dazu wurde die [³⁵S]-markierte Virussuspension in DMEM-Kulturmedium ohne FCS entsprechend vorverdünnt und mit dem gleichen Volumenanteil Antikörper-Lösung (6,2 µg IgG/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente [³⁵S]-markierte Virussuspension, die ohne AK-Lösung vorinkubiert wurde. Für die Negativkontrolle (nicht-gebundenes Virus) wurde die Virussuspension in Anwesenheit von 100 IU/ml Heparin an die Zellen adsorbiert, oder die Adsorption erfolgte alternativ an mit Heparin-vorinkubierten Zellen (100 IU/ml für 90 min bei 4°C). 2 x 10⁵ konfluente U73-CAT/VP16-Zellen wurden für 1 h bei 4°C mit den Virus-Antikörper-Lösungen, die zuvor auf 4°C abgekühlt wurden, inkubiert und wie unter 4.3.5 beschrieben weiterbehandelt. Je 10 µl der erhaltenen Zellysate wurden mittels Szintillationsmessung (s. 4.3.4.1) analysiert.

Die ermittelten cpm der beiden voneinander unabhängigen Versuchsansätze (A und B) wurden berechnet (cpm/well), die Werte der Doppelbestimmungen gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 33A, B). Die errechneten cpm/well für die Positivkontrolle (gebundenes Virus) lagen im Versuchsansatz A bei etwa 47.000 cpm, im Versuchsansatz B bei etwa 37. 000 cpm. Bezogen auf die eingesetzte Menge (A= 3,5 x 10⁶ cpm/well; B= 2,9 x 10⁶ cpm/well) wurden im Versuchsansatz

A 1,34% der Viren, im Versuchsansatz B 1,27 % der Viren gebunden, so dass die Ergebnisse beider Versuchsansätze miteinander verglichen werden konnten.

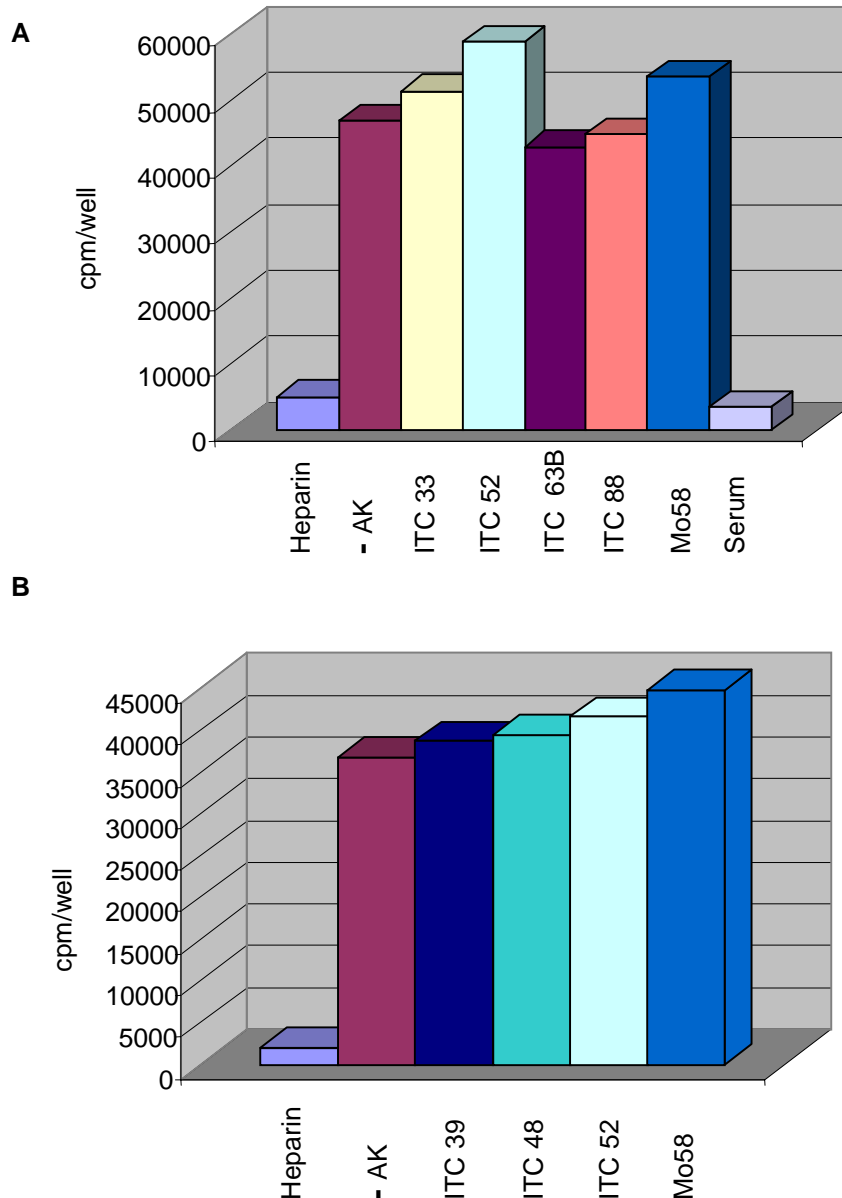


Abb. 33 A, B Attachment-Assay unter AK-Einfluss (6,2 µg/ml)

(A) Graphische Darstellung des HCMV-Attachment in Anwesenheit der monoklonalen humanen gB-AK: ITC 33, 52, 63B und 88 (cpm/well). Als Negativ-Kontrolle wurden mit Heparin vorinkubierte U373-CAT/VP16-Zellen (Heparin) verwendet, als nicht-Attachment-inhibierender Kontrollantikörper wurde der pp65-spezifische-AK Mo58, als Attachment-inhibierender Kontrollantikörper wurde ein HCMV-positives Humanserum (Serum) verwendet.

(B) Graphische Darstellung des HCMV-Attachment in Anwesenheit der monoklonalen humanen gB-AK: ITC 39, 48 und 52 (cpm/well). Als Negativ-Kontrolle (nicht-adsorbiertes Virus) diente HCMV, das in Anwesenheit von Heparin mit U373-CAT/VP16-Zellen inkubiert wurde (Heparin), als nicht-Attachment-inhibierender Kontrollantikörper wurde der pp65-spezifische-AK Mo58 eingesetzt.

In Anwesenheit des Kontrollantikörpers Mo58 konnte, gemessen an der Positivkontrolle (Virus-Adsorption ohne AK), eine geringfügig höhere Virusadsorption beobachtet werden. Die Virus-Adsorption in Anwesenheit der gB-spezifischen Antikörper bewegte sich entweder zum Teil geringfügig unter den Werten (ITC 88, ITC 63B) oder geringfügig über den Werten der Positivkontrolle (ITC 33, 39, 48, 52). Durch das Humanserum konnte die Virus-Bindung fast vollständig inhibiert werden.

Keiner der untersuchten gB-spezifischen Antikörper inhibierte die initiale Virus-Bindung, so dass die unterschiedlich starke Fusionsinhibierung der gB-AK bei konstanter IgG-Konzentration nicht durch Unterschiede in der Inhibierung des Attachment erklärt werden konnte.

5.3.2 Differenzierung zwischen HSPG-Bindung und Rezeptorbindung

Die initiale Bindung des Virus an HSPGs der Wirtszellmembran unterliegt einer Kinetik. Es konnte gezeigt werden, dass die zunächst niederaffine Bindung an HSPGs innerhalb von Minuten zu einer hochaffinen Bindung, vermutlich durch spezifische Bindung viraler Glykoproteine an zelluläre Rezeptorproteinen, konvertiert (Compton *et al.*, 1993). Die Bindung des Virus an HSPGs kann durch Konkurrenz mittels Heparin wieder gelöst werden, während die spezifische Bindung an zelluläre Rezeptoren nicht reversibel ist.

Da mittels des durchgeführten Attachment-Assays keine Differenzierung zwischen HSPG-Bindung und Rezeptorbindung möglich war, wurde der Assay weiter modifiziert, so dass untersucht werden konnte, ob die unterschiedlich starke Fusionsinhibierung durch Inhibierung der gB-Rezeptorbindung verursacht wurde.

5.3.3 Attachment-Assay unter AK-Einfluss und Heparinablösung

Zur Untersuchung der gB-spezifischen Rezeptor-Bindung in Anwesenheit gB-spezifischer AK wurden die vier AK ITC 33, 52, 63B und 88, sowie der Kontrollantikörper Mo58 ausgewählt. Die Vorinkubation von Antikörper-Lösung und [³⁵S]-markierte Virussuspension, sowie die Virus-Adsorption auf konfluenten U373-CAT/VP16 Zellen erfolgte wie unter 5.3.1 beschrieben.

Nach erfolgter Virus-Adsorption wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 4°C mit einer Heparin-Lösung 100 µg/ml inkubiert. Der Heparin-sensitive Überstand wurde abgenommen und die mit PBS gewaschenen Zellen wie unter 4.3.5 beschrieben lysiert (Heparin-resistentes Zellysate).

Je 10 µl der Heparin-sensitiven und -resistenten Zellysate wurden mittels Szintillationsmessung (s. 4.3.4.1) analysiert. Die ermittelten cpm der beiden Versuchsansätze wurden berechnet (cpm/well), die Werte der Doppelbestimmungen gemittelt und für die Heparin-resistenten Werte graphisch dargestellt (Abb. 34). Sowohl in Anwesenheit des Kontrollantikörpers Mo58, als auch für die gb-spezifischen Antikörper ITC 33, 52 und 63B wurde, gemessen an der Positivkontrolle (Virus ohne AK), eine leicht verbesserte Rezeptorbindung festgestellt. Die Inkubation von HCMV mit dem AD2-spezifische AK ITC 88 führte dagegen zu einer um etwa 30% verminderten Rezeptorbindung. Dieses Ergebnis konnte auch durch die Heparin-sensitiven Messwerte als Maß für die Ablösbarkeit des Virus in Anwesenheit von AK bestätigt werden (nicht gezeigt).

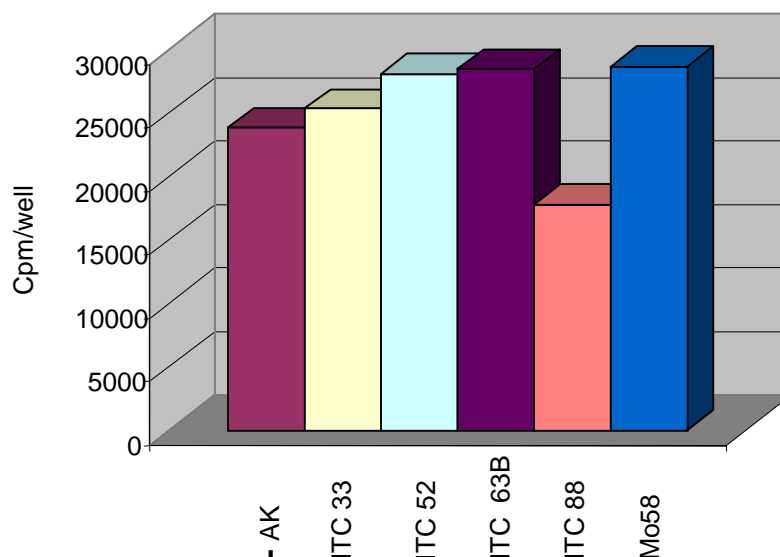


Abb. 34 Rezeptorbindung des HCMV in Anwesenheit gB-spezifischer AK

Graphische Darstellung der Heparin-resistenten Radioaktivität nach HCMV-Rezeptorbindung in Anwesenheit der monoklonalen humanen gB-AK: ITC 33, 52, 63B und ITC 88 (cpm/well). Als Kontrollantikörper wurde der pp65-spezifische-AK Mo58 verwendet, als Positivkontrolle ist die HCMV-Rezeptorbindung ohne AK (-AK) dargestellt.

Um beide Messwerte in das Ergebnis einfließen zu lassen, wurde der Quotient aus Heparin- resistenten und Heparin-sensitiven Werten errechnet.

Tabelle 4: Quotient aus Heparin-resistenten und sensitiven Messwerten

AK	Quotient
ohne AK	1,77
ITC 33	2,00
ITC 52	2,30
ITC 63B	1,80
ITC 88	0,97
Mo58	1,60

Die Anlagerung des ITC 88 an die antigene Domäne 2 (AD2) des gB führte offenbar zu einer verminderten Rezeptorbindung der HCMV Glykoproteine.

5.4 Untersuchungen unter Verwendung des rekombinanten AD2-Epitops

Die AD2 konnte im N-terminalen Bereich des gB an AS Position 67-86 kartiert werden (Ohlin *et al.*, 1993).

Um zu klären, ob die AD2 des gB direkt oder indirekt an der Rezeptorbindung beteiligt ist, wurde dieser Bereich des gB näher untersucht. Dazu wurde die AD2 bakteriell als Glutathion S-Transferase Fusionsprotein (GST-AD2) exprimiert und an U373-Zellen gebunden. Mittels Fusions-Assay wurde der Einfluss der AD2-Bindung an U373-Zellen auf die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion untersucht.

5.4.1 Herstellung des Konstruktes pGEX-gB-AD2

Für die Herstellung des Konstruktes pGEX-gB-AD2 (Abb. 35) wurde die Sequenz der AD2 aus der Vektor-DNA pRc/CMV-gB mit den Oligonukleotiden gBAD2f und gBAD2r (s. 3.15.2) mittels PCR wie unter 4.1.9 beschrieben amplifiziert. Das 84 bp große Fragment wurde nach Restriktion mit BamHI und XhoI, in den linearisierten Vektor pGEX-6P-1 unter Erhalt des korrekten Leserasters der GST-Sequenz inseriert und in *E.coli* XL-1Blue-Zellen (s. 3.13.1) transformiert (s. 4.1.8.2). Die Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienklonen wurde mittels Restriktion und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. 4.1.5) auf Insertion des 84 bp großen DNA-Fragments überprüft. Die GST-AD2-Sequenz der Plasmid-DNA positiver Klone wurde durch Sequenzierung (s. 4.1.10) mit den Oligonukleotiden pGEXf und pGEXr (s. 3.15.1) analysiert und enthielt keine Mutationen.

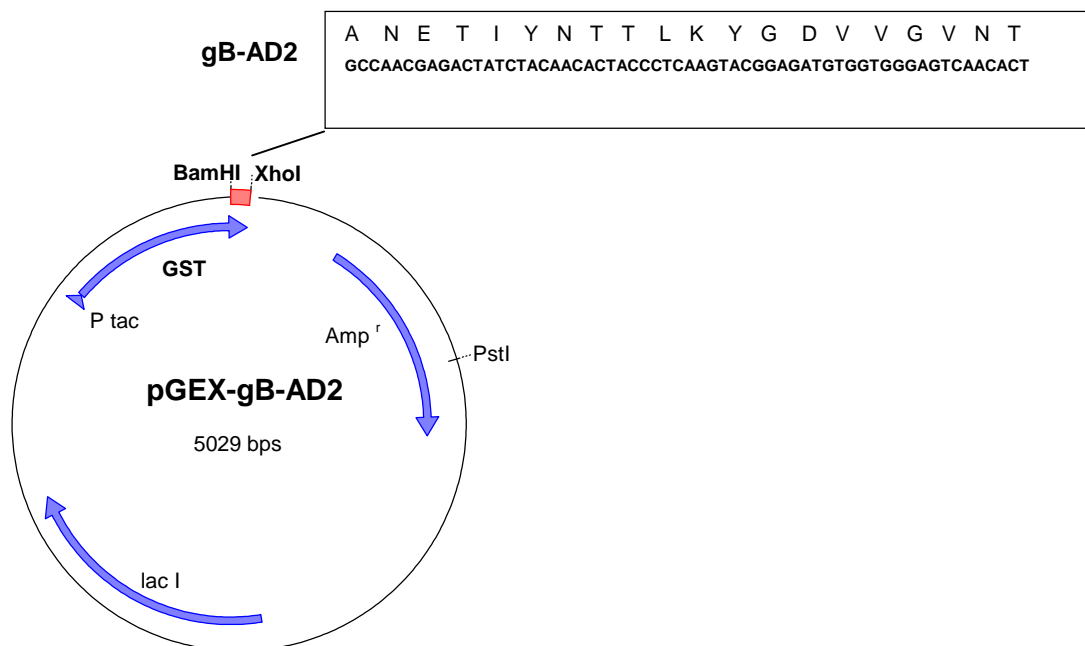


Abb. 35 Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionskonstruktes pGEX-gB-AD2

Dargestellt ist der Vektor pGEX-6P-1 mit dem tac Promotor (P_{tac}), dem β -Laktamase-Gen (Amp^r), dem lac I^q-Gen (lac I) und dem GST-Gen (GST), sowie dem klonierten DNA-Fragment gB-AD2. Die Sequenz des gB-Fragments ist vergrößert dargestellt.

5.4.2 Bakterielle Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins GST-AD2 und GST

Zur Expression des Fusionsproteins GST-AD2 wurde das Konstrukt pGEX-gB-AD2, sowie als Kontrollkonstrukt der Vektor pGEX-6P-1 in *E.coli* BL21-Zellen (s. 3.13.2) transformiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine und deren Aufreinigung erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Die Affinitätsreinigung des GST-AD2-Fusionsproteins und des Kontrollproteins GST wurde mittels 12%iger SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung (s. 4.4.1.1) überprüft (Abb. 36).

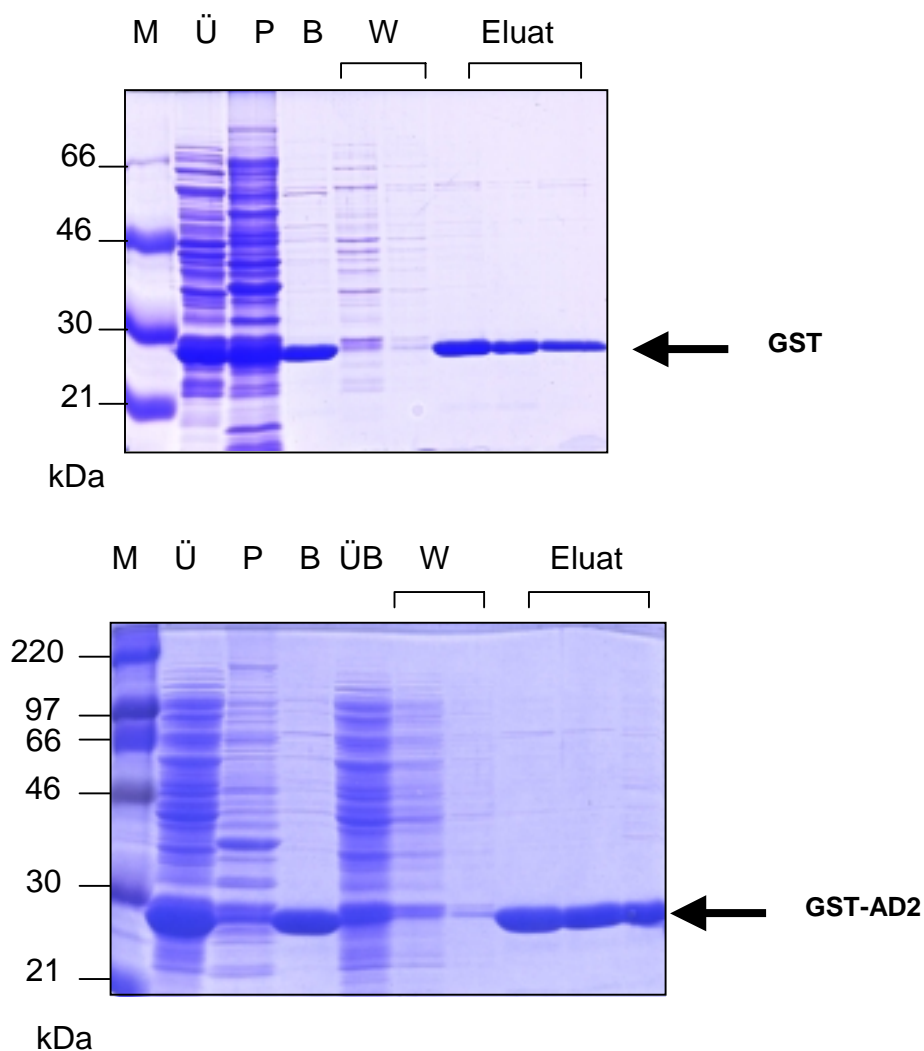


Abb. 36 Darstellung der Affinitäts-Reinigung des GST und des Fusionsproteins GST-AD2

Coomassiefärbung nach 12%iger SDS-PAGE. Aufgetragen wurden: Markerproteine (M), 30 µl des Überstandes nach Lyse (Ü), 10 µl des resuspendierten Bakterienpelletts (P), 10 µl des an Glutathion-Sepharose 4B-gebundenen Lysates (B), 30 µl des Überstandes nach Bindung (ÜB), je 30 µl der Waschschrte (W) sowie 10 µl der Eluate 1-3.

Das Fusionsprotein GST-AD2 und das Kontrollprotein GST ließen sich in *E.coli* stabil exprimieren und konnten nach Affinitätsreinigung in drei Elutionsschritten eluiert werden. Das Molekulargewicht des GST betrug 26 kDa, das errechnete Molekulargewicht des GST-AD2 28 kDa. Die Überprüfung der Immunreaktivität des gereinigten Fusionsproteins GST-AD2 erfolgte mittels Immunoblot (s. 4.5.1) mit dem AD2-spezifischen AK ITC 88 (1:100 in Antikörperpuffer). Als Zweitantikörper wurde ein HRP-konjugierter-Anti-Human-AK (1:5000 in Antikörperpuffer) verwendet. Das gereinigte bakterielle Fusionsprotein GST-AD2 wurde von dem AK ITC 88 spezifisch erkannt, während das Kontrollprotein GST nicht detektiert werden konnte (Abb. 37).

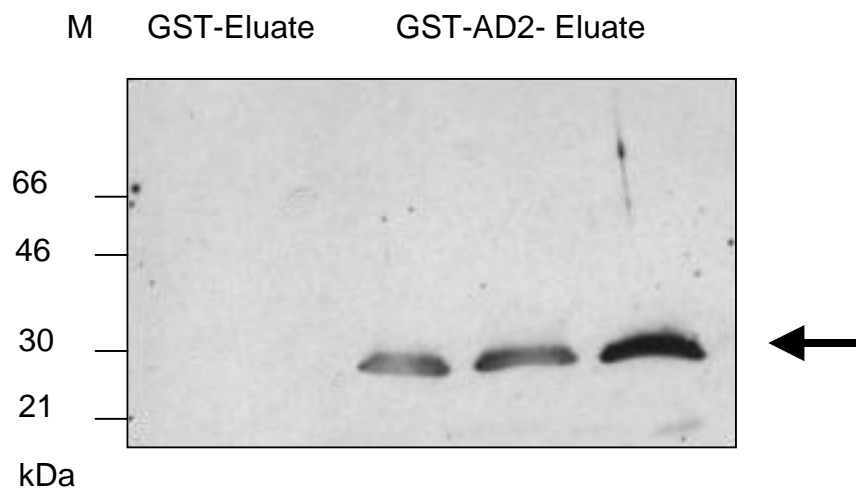


Abb. 37 Immunoblot des GST und des Fusionsproteins GST-AD2 nach Inkubation mit dem AD2-spezifischen AK ITC 88

Immunoblot nach 12%iger SDS-PAGE von GST-Eluaten 1-3 (je 5 µl) und GST-AD2-Eluaten 1-3 (je 1µl).

5.4.3 Bindung des Fusionsproteins GST-AD2 an U373-Zellen

Für die Bindung des Fusionsproteins GST-AD2 an U373-Zellen wurde zunächst die Proteinkonzentration der GST und GST-AD2- Eluate wie unter 4.2.1.2. beschrieben ermittelt. Die Konzentration des GST-Proteins betrug 1200 µg Protein/ml, die des GST-AD2 1800 µg/ml.

Für die Bindungsexperimente wurde eine Konzentration von 100 µg Fusionsprotein/10⁵ Zellen eingesetzt. Der Nachweis des gebundenen Proteins erfolgte durch modifizierte Oberflächen-Immunfluoreszenz (s. 4.5.2.3) mit einem Anti-GST-Antikörper. Als Negativkontrolle wurde das Kontrollprotein GST verwendet. Subkonfluente U373-CAT/VP16-Zellen wurden zur Bindung des Fusionsproteins 1 h bei RT mit 100 µg GST-AD2- oder GST-Proteinlösung inkubiert. Für die modifizierte Oberflächen-Immunfluoreszenz wurde als Erstantikörper ein Ziege Anti-GST-Antikörper (1:100 in PBS), als Zweitantikörper ein FITC-konjugierter Anti-Ziege-AK (1:50 in BSA-Lösung) verwendet. Um eine durch die AK verursachte unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurden nicht-behandelte Zellen mit Erst- und Zweitantikörper inkubiert.

**U373-CAT/VP16
α GST AK**

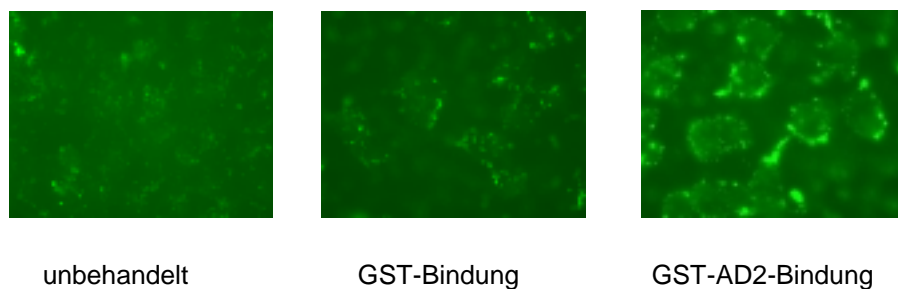


Abb. 38 Oberflächenimmunfluoreszenz nach GST- und GST-AD2-Bindung an U373-CAT/VP16-Zellen

Fluoreszenz-immunologische Darstellung von unbehandelten U373-CAT/VP16 Zellen (unbehandelt), nach Bindung des Kontrollproteins GST (GST-Bindung) und nach Bindung des Fusionsproteins GST-AD2 (GST-AD2 Bindung) mit Hilfe des Anti-GST-AK und des Anti-Ziege FITC-konjugierten Zweitantikörpers.

Für die Kontrollfärbung von unbehandelten Zellen konnte keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden. Für das Kontrollprotein GST konnte vereinzelt eine schwache Bindung an U373-CAT/VP16-Zellen festgestellt werden, während die Bindung des GST-AD2-Fusionsproteins an U373-CAT/VP16-Zellen sehr spezifisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 38).

5.4.4 Fusions-Assay nach GST-AD2 Bindung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die bakteriell exprimierte AD2 des gB spezifisch an U373-Zellen binden kann, wurde untersucht, welche Auswirkungen diese Bindung auf die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion hat.

Dazu wurde sowohl das Kontrollprotein GST, als auch das Fusionsprotein GST-AD2 in unterschiedlichen Konzentrationen (45-240 µg Protein pro Well) an U373-CAT/VP16-Zellen gebunden und im Fusions-Assay untersucht. Die Proteinkonzentration des Kontrollproteins/Well lag dabei um etwa 30% über den Werten für das GST-AD2-Fusionsproteins. Die Proteine wurden wie unter 5.4.3 beschrieben an U373-CAT/VP16 Zellen gebunden und anschließend mit einer *moi* von 0,5 infiziert. Als Positivkontrolle wurden nicht-behandelte U373-CAT/VP16 Zellen verwendet. Die interne Assay-Kontrolle bestand aus kokultivierten nicht-infizierten U373-CAT/VP16 Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach Infektion in 50 µl Lysispuffer geerntet und mittels CAT-Assay auf CAT-Expression analysiert.

Die ermittelte CAT-Expression (% monoacetyl. CAMP) in Anwesenheit des Kontrollproteins GST lag zwischen 35 und 45 %. Die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion wurde, gemessen an den Werten für die unbehandelten Zellen, durch die Inkubation der Zellen mit dem Kontrollprotein GST beeinträchtigt. Die Ergebnisse für das GST-AD2-Fusionsprotein, zeigten im Durchschnitt eine CAT-Expression von 45- 50% monoacetyliertem CAMP, so dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Bindung der AD2 an U373-CAT-VP16-Zellen zu keiner Inhibierung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion führte (Abb. 39).

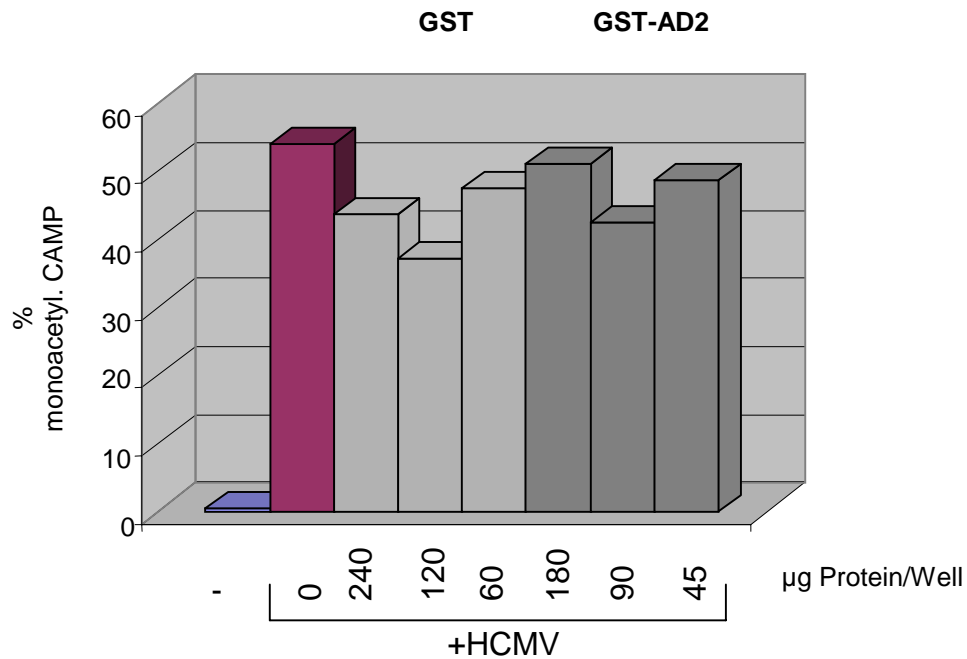


Abb. 39 HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion nach GST-AD2-Bindung

Graphische Darstellung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion (% monoacetyliertes CAMP) von unbehandelten und infizierten U373-CAT/VP16 Zellen (0), oder mit 240, 120, 60 µg GST-Protein und 180, 90, 45 µg GST-AD2-Fusionsprotein vorinkubierten und infizierten (moi=0,5) Zellen, sowie von kokultivierten nicht-infizierten U373-CAT/VP16-Zellen (-) als Negativkontrolle.

6 Diskussion

Die in der viralen Hüllmembran inserierten Glykoproteine des HCMV sind die Vermittler des initialen Virus-Wirtszell-Kontakts. Für das HCMV wurden bisher sechs Membranglykoproteine, gB, gH, gL, gM, gN und gO, beschrieben, die auf der Virusoberfläche in Form hochmolekularer Glykoproteinkomplexe organisiert sind (Britt, 1984; Huber *et al.*, 1997; Mach *et al.*, 2000). Neben der Virus-Adsorption leiten sie vermutlich auch die Fusion von Virus- und Plasma-Membran ein (Penetration). Der Fusionsvorgang selbst ist pH-unabhängig (Compton *et al.*, 1992) und ermöglicht es dem viralen Partikel in die Wirtszelle einzudringen. Die Untersuchung komplexer Vorgänge wie die virale Adsorption und Penetration, die eng gekoppelt sind, erfordert empfindliche und reproduzierbare Meßmethoden, die jedoch für das HCMV-System bisher nur in begrenztem Umfang vorliegen.

Im Falle von HSV 1 wird die Untersuchung fusionsrelevanter Glykoproteine durch die gezielte Herstellung von Virusmutanten und das Vorkommen natürlicher Virusmutanten erleichtert (Shukla & Spear, 2001). Für das HCMV steht die Herstellung von Virusmutanten erst seit kurzem durch die BAC-Mutagenese (Borst *et al.*, 1999) zur Verfügung, jedoch ist aufgrund des fehlenden komplementierenden Zellsystems die Herstellung von Virusmutanten mit Deletionen in essentiellen Genen, wie denen der Hauptglykoproteine der Virushülle, nicht möglich (Strive, 2000), so dass die Frage nach der Beteiligung eines bestimmten Glykoproteins an Adsorption und/oder Fusion derzeit noch nicht direkt beantwortet werden kann.

6.1 **Etablierung eines Fusions-Assays zur Untersuchung der Zell-Zell-Fusion**

Grundlage zur Untersuchung der HCMV-vermittelten Fusion war die Etablierung eines Fusions-Assay, mit dem zuverlässig und reproduzierbar virusinduzierte Fusion ermittelt und quantifiziert werden konnte. Basis für die Untersuchung der virusinduzierten Fusion ist die Entstehung von mehrkernigen Zellen (Syncytien) als Folge der Wirkung des HCMV als „Fusionsfaktor“. Die Zell-Zell-Fusion wird dabei als Ausmaß der erfolgreichen Virusinfektion definiert und wurde bislang rein optisch, durch lichtmikroskopische Auszählung mehrkerniger

Zellen ausgewertet (Navarro *et al.*, 1993; Milne *et al.*, 1998). Sensitivere Methoden zur Untersuchung virusvermittelter Zell-Zell-Fusionen sind Reporter-gen-Aktivierungs-Assays, die anhand eines geeigneten Markers, z.B. der β -Galaktosidase, Fusion in Enzymaktivität übersetzen (Cohen & Melikyan, 1998). Der in dieser Arbeit vorgestellte CAT-Reporter-gen-Aktivierungs-Assay beruht auf der Transkriptions-Aktivierung des Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gens durch den Transaktivator GAL4-VP16. Durch Cokultivierung von GAL4-VP16-exprimierenden Zellen mit CAT-Reporter-gen-Zellen und anschließender Zell-Zell-Fusion werden Fusionsereignisse nach erfolgreicher Transkriptionsaktivierung in CAT-Expression übersetzt und mittels CAT-Assay nachgewiesen (Gicklhorn *et al.*, 1999).

Da die spezifischen zellulären Rezeptoren für das HCMV bisher unbekannt sind, mussten für den Fusions-Assay Zellen ausgewählt werden, die für das HCMV permissiv sind. Des weiteren musste gewährleistet werden, dass die Virus-Infektion auch zu einer erfolgreichen Zell-Zell-Fusion führt. Aufgrund der ausgeprägten Spezies- und Zelltypsspezifität lassen sich nur humane Fibroblasten und U373-Zellen effizient mit HCMV infizieren und gewährleisten so ausreichend messbare Zell-Zell-Fusion. Primäre humane Fibroblastenkulturen eignen sich aufgrund ihres begrenzten Wachstums nicht für die Herstellung stabiler Zelllinien, so dass für die Fusions-Untersuchungen Astrocytomazellen (U373), immortalisierte Derivate eines Neuroglia-Tumors, ausgewählt wurden.

Die transienten Transfektionen mit dem Transaktivator-Konstrukt und Reporter-gen-Konstrukt führten nach Cokultivierung und PEG-Fusion der Zellen zur erfolgreichen Transkriptionsaktivierung (s. Abb. 16 B). Zudem konnte eine unspezifische Transkriptionsaktivierung durch zelluläre Faktoren ausgeschlossen werden, so dass die U373-Zellen grundsätzlich für dieses System geeignet waren. Durch die Herstellung stabil exprimierender U373-Transaktivator-Zellen und CAT-Reporter-gen-Zellen wurde es ermöglicht sowohl PEG- als auch HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion zuverlässig in CAT-Enzymaktivität zu übersetzen (s. Abb. 17).

Die nachgewiesene Zell-Zell-Fusion (24 h p.i) erwies sich als HCMV-spezifisch, da sowohl für zellfreien Virusüberstand als auch für sedimentierte Virionen (s. Abb. 18) eine deutliche Induktion der CAT-Expression nachgewiesen werden konnte. Die erhaltenen schwächeren Signale für nicht infizierte, kokultivierte U373-CAT/VP16-Zellen wurden als spontane Eigenfusion der U373-Zellen, die auch von Bold (1997) beschrieben wurde, interpretiert. Für U373-CAT/VP16-Zellen, die mit dem nicht-virushaltigen, ultrazentrifugierten Kulturüberstand infiziert wurden, konnten ebenfalls schwache CAT-Signale erhalten werden, die vermutlich durch eine nicht vollständige Sedimentation der Virionen bedingt war. Die messbare Zell-Zell-Fusion könnte andererseits auch durch fusionsaktive virale Membranen defekter Viruspartikel, die durch eine Ultrazentrifugation bei 100.000 x g nicht sedimentiert werden, bedingt sein.

Durch die Infektion von nicht kokultivierten U373-CAT-Zellen mit zellfreiem Virusüberstand wurde belegt, dass die ermittelte CAT-Aktivität die Folge einer HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion ist und nicht durch HCMV-spezifische Transaktivatoren, die früh nach Infektion exprimiert werden, induziert wird (s. Abb. 19 A, Spur 1). Das erhaltene Signal entsprach dem der kokultivierten Zellen und wurde als Hintergrundsignal gewertet. Die Infektion von U373-CAT/VP16-Zellen mit ansteigender Virusmenge führte zu einem messbaren Anstieg an CAT-Expression (s. Abb. 19 A/B), so dass HCMV-vermittelte Fusionsereignisse (moi 0,1-2,0) quantitativ ausgewertet werden konnten.

6.2 Identifizierung der am Fusionsvorgang beteiligten Glykoproteine

Vor allem Untersuchungen an stabilen, gB-exprimierenden Zelllinien ließen vermuten, dass solitär exprimiertes gB über Fusionsaktivität verfügt (Tugizov *et al.*, 1994; Bold *et al.*, 1996). Für die solitär exprimierten Glykoproteine H/L wird hingegen keine eigenständige Fusionsaktivität postuliert, jedoch eine indirekte Beteiligung am Fusionsvorgang angenommen (Milne *et al.*, 1998). Vergleichbare Daten für die Glykoproteine B und D wurden auch für das HSV-1 beschrieben (Campadelli-Fiume *et al.*, 1988; Butcher *et al.*, 1990), jedoch konnte von Turner *et al.*, 1998 erstmals in einem transienten Fusions-Assay gezeigt werden, dass die Coexpression der vier Glykoproteine des HSV-1, gB, gD und gH/L für die Zell-Zell-

Fusion sowohl notwendig, als auch hinreichend sind. Nur die Coexpression aller vier Glykoproteine in ein und derselben Zelle führte zur Zell-Zell-Fusion.

Um die Beteiligung der Glykoproteine B, H/L am Fusionsvorgang des HCMV mit Hilfe des etablierten Fusions-Assay zu identifizieren, wurde zunächst der ORF 115 des gL kloniert und als „Myc-His-epitopmarkiertes“ Protein exprimiert. Die Funktion des nicht-membranverankerten gL, den Transport des Glykoproteins H zur Zelloberfläche zu ermöglichen (Kaye *et al.*, 1992; Spaete *et al.*, 1993), konnte durch Cotransfektionsstudien und anschließender Oberflächen-Immunfluoreszenz bestätigt werden (s. Abb. 24).

Die Expression des gB auf der Zelloberfläche, von der es reinternalisiert wird (Tooze *et al.*, 1993; Radsak *et al.*, 1996), wird vermutlich durch Internalisierungssignale im cytoplasmatischen Anteil des Proteins beeinflusst (Tugizov *et al.*, 1999; Scheffczik *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang soll der Phosphorylierungsstatus des Moleküls an AS-Position Ser₉₀₀ eine entscheidende Rolle spielen (Fish *et al.*, 1998).

Durch Austausch des cytoplasmatischen Anteils des gB durch den des Vesicular-Stomatitis-Virus-G-Proteins, ein virales Glykoprotein, das hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde die mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz ermittelte schwache Expression des Wildtyps gB deutlich gesteigert (s. Abb. 21). Die Transfektionseffizienz nach Lipofectin-vermittelter Transfektion für alle verwendeten Expressionskonstrukte wurde durch indirekte-Immunfluoreszenz ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Mittels Fusions-Assay konnte weder für das solitär exprimierte Glykoprotein B noch für die Glykoproteine H/L Fusionsaktivität in U373-Zellen nachgewiesen werden. In Kontroll-Transfektions-Ansätzen mit vektorieller DNA wurde die durch das Transfektionsreagenz Lipofectin vermittelte Zell-Zell-Fusion nachgewiesen, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass der CAT-Reportergen-Aktivierungs-Assay nicht sensitiv genug für die Ermittlung von glykoproteinvermittelten Zell-Zell-Fusionen ist (s. Abb. 26 A/B).

Nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die erzielten Transfektionseffizienzen zu gering waren, um Glykoprotein-vermittelte Zell-Zell-Fusion zu induzieren. Die Austestung anderer Transfektions-Reagenzien, z.T. auch nicht Liposomen-vermittelter, zur Steigerung der Transfektions-Effizienz, führte jedoch zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Coexpressionen der drei HCMV-Glykoproteine B und H/L, bzw. B-VSV-G und H/L war offensichtlich für die Induktion der Zell-Zell-Fusion ebenfalls nicht ausreichend. Jedoch konnte sowohl für das solitär exprimierte gB-VSV-G, als auch für coexprimiertes gB-VSV-G und gH/gL eine leichte Steigerung der Zell-Zell-Fusion beobachtet werden (s. Abb. 26 A/B), so dass die oben angesprochene Problematik der Oberflächen-Exposition des Glykoproteins B erhärtet wird. Die ermittelten CAT-Aktivitäten lagen mit etwa 5% jedoch in einem nicht aussagefähigen Bereich. Die aufgetretene Diskrepanz zwischen gut messbaren virusinduzierten Zell-Zell-Fusionen und nicht, bzw. schwach detektierbaren Glykoprotein-vermittelten Zell-Zell-Fusionen führte zu folgenden Überlegungen:

Der etablierte Fusions-Assay basiert auf der homologen Fusion von U373-Zellen. Da sich die Membranen der eingesetzten Virionen von Fibroblastenmembranen ableiten, die sich vermutlich in ihrer Zusammensetzung von U373-Membranen unterscheiden (Norton *et al.*, 1975), könnte die Membranzusammensetzung ein entscheidender Faktor für die nicht induzierbare Glykoprotein-vermittelte Zell-Zell-Fusion sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Virionen aus U373-Zellen angezüchtet und mittels Fusions-Assay analysiert. Die Fusionsaktivität der aus U373-Zellen gewonnenen Virionen war jedoch nicht eingeschränkt (Daten nicht gezeigt), so dass die in U373-Membranen inserierten Glykoproteine grundsätzlich fusionsaktiv sein müssen.

Im Falle eines homologen Fusions-Assay verfügen auch die Effektor-Zellen, die die Glykoproteine auf ihrer Zelloberfläche exponieren, über dieselben zellulären Rezeptoren wie die Zielzellen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die exponierten Glykoproteine bereits an Rezeptoren auf den Effektor-Zellen binden und so nicht mehr für die Rezeptorbindung auf den Zielzellen zur Verfügung stehen.

Für das HSV 1 konnte gezeigt werden, dass die Coexpression des HSV 1 gD-Rezeptors mit den fusogenen Glykoproteinen B, D und H/L in derselben Zelle zu einer Reduktion der Zell-Zell-Fusion führt (Pertel *et al.*, 2001). Fraglich ist jedoch, ob die Überexpression des gD-Rezeptors mit den Bedingungen im hier verwendeten System verglichen werden kann.

Möglicherweise führte die Kombination aus relativ niedriger Transfektions-effizienz, geringer Oberflächenexposition und Glykoprotein-Rezeptorbindung auf derselben Zelle zu dem beobachteten Ergebnis. Andererseits ist selbst innerhalb der α -Herpesviren die Induktion der Zell-Zell-Fusion nicht konserviert, so führt z.B. für das Varizella-Zoster Virus sowohl die Coexpression der Glykoproteine H und L, als auch der Glykoproteine B und E zur Induktion der Zell-Zell-Fusion (Maresova *et al.*, 2001). Das HCMV, das jedoch weder über ein gD-, noch ein gE-Homologes verfügt, besitzt neben den vier homologen Glykoproteinen gB, gH, gL und gM zwei weitere, nicht homologe Proteine, gO und gN. Diese, derzeit noch nicht näher charakterisierten Glykoproteine könnten theoretisch ebenfalls potentielle fusogene oder rezeptorbindende Proteine sein. Des weiteren sind vergleichende Studien bezüglich der Glykoprotein-Zusammensetzung in der viralen Membran und der transfizierter Zellen, die bislang nicht beschrieben wurden, für die Untersuchung der Zell-Zell-Fusion notwendig und hilfreich.

6.3 Untersuchung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion mit Glykoprotein-spezifischen Antikörpern

Aufgrund des immunogenen Charakters der Glykoproteine B und H, für die u.a. auch die Induktion virusneutralisierender Antikörper beschrieben wurde (Britt & Mach, 1996), kann von einer Beteiligung der Glykoproteine B und H sowohl an der Adsorption, als auch an der HCMV-vermittelten Fusion ausgegangen werden. Der Nachweis der Fusionsinhibierung durch einen monoklonalen gB-spezifischen und einen polyklonalen gH-spezifischen Antikörper mittels Fusions-Assay belegte eindeutig, dass sowohl das Glykoprotein B, als auch das Glykoprotein H an den initialen Virus-Wirtszell-Interaktionen des HCMV beteiligt ist (s. Abb. 28) und der etablierte Fusions-Assay für Fusionsinhibierungsstudien geeignet ist.

Die vorgenommenen Modifizierungen des Fusions-Assay zur Untersuchung der Fusionsinhibierung, führten zu der Erkenntnis, dass die Länge der Virus-Antikörper-Vorinkubation bei 37°C als kritisch betrachtet werden muss (s. Abb. 27). Die in der Literatur beschriebene Neutralisation durch eine vierstündige Inkubation bei 37°C, bewirkt nach unseren Beobachtungen, dass die Fusionsaktivität der Viruspräparation drastisch reduziert wird. Um die maximale Fusionsaktivität des Virus zu erhalten, wurde daher die Dauer der Virus-Antikörper-Vorinkubation auf eine Stunde begrenzt. Die Antikörper-Vorinkubation des Virus führte dazu, dass sich das Gesamtvolumen des Infektionsmediums verdoppelte. Da die Effizienz der Virusadsorption mit steigendem Gesamtvolumen abnimmt (Daten nicht gezeigt), wurden die Zellen zwangsläufig mit einer geringeren *moi* infiziert. Da sich die CAT-Expression durch längere Cokultivierungsdauer der Zellen steigern ließ (Daten nicht gezeigt), wurde die Cokultivierungsdauer der Zellen für die Fusionsinhibierungsstudien von 24 h auf 48 h erhöht.

Durch Experimente mittels PAA konnte ausgeschlossen werden, dass 48 h p.i. neusynthetisierte virale Genprodukte die ermittelte Zell-Zell-Fusion positiv oder negativ beeinflussten (s. 5.2.1.2). Aufgrund des längeren Infektionszyklus in U373-Zellen (96 h), verglichen mit dem primärer Fibroblasten (72 h) (Reis *et al.*, 1993), findet eine effiziente Neusynthese früher viraler Glykoproteine (Smuda *et al.*, 1997) 48 h p.i. unter den verwendeten Bedingungen offenbar noch nicht statt.

Die Analyse Fusions- und/oder Attachment-inhibierender Antikörper, kann einen Beitrag zum besseren Verständnis der virusvermittelten Fusion leisten, da potentielle fusogene oder rezeptorbindende Domänen auf diesem Wege identifiziert werden können. So bildeten u.a. die Untersuchungen von neutralisierenden V3-spezifischen Antikörpern des HIV (Armstrong *et al.*, 1996), die Grundlagen für die heutige Vorstellung, dass die V3-Domäne an der Corezeptorbindung des gp120 entscheidend beteiligt ist (Choe *et al.*, 1996; Trkola *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Speck *et al.*, 1997; Platt *et al.*, 2001).

Um die Fusionseigenschaften des Glykoproteins B näher zu untersuchen, wurden monoklonale humane gB-spezifische Antikörper, die verschiedene Epitope des gB erkennen, mittels Fusions-Assay analysiert.

Die Ammoniumsulfat-präzipitierten AD1 und AD2 spezifischen gB-Antikörper erwiesen sich nach der Fällung als funktionell, wie durch Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte (s. Abb. 31). Die Quantifizierung der gefällten IgGs gewährleistete eine Untersuchung der Fusionsinhibierung bei konstanter IgG-Konzentration. Bei einer IgG-Konzentration von 6,2 µg IgG/ml wurde für den AD2 spezifischen AK ITC 88 eine 95%ige Fusionsinhibierung detektiert, während AD1 spezifische AK Fusionsinhibierung zwischen 30-60% zeigten. Die Fusionsinhibierung betraf mit einer Ausnahme (ITC 33) ausschließlich AK, die mittels Neutralisations-Assay, als Virus-neutralisierend beschrieben wurden (Ohlin *et al.*, 1993). Da die eingesetzten Kontrollantikörper Mo58 (Negativkontrolle) und das Vollserum (Positivkontrolle) entsprechend funktionell waren (s. Abb. 32), muss aufgrund der vorliegenden Daten angezweifelt werden, dass es sich bei dem AK ITC 33 um einen nicht-neutralisierenden AK handelt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte, entgegen den Erwartungen, nicht der AD1, die in der Literatur als immundominant beschrieben wird (Schoppel *et al.*, 1997), sondern in erster Linie der AD2 eine entscheidende Funktion bei der HCMV-vermittelten Fusion und/oder Adsorption zugeschrieben werden.

6.4 Untersuchungen zum Fusions-Mechanismus

Bei der HCMV-vermittelten Fusion lassen sich mehrere nacheinander ablaufende Prozesse unterscheiden: es wird davon ausgegangen, dass die initiale Bindung des Virus (attachment) über Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) der Wirtszelle vermittelt wird (siehe Einleitung 1.3.3.1). Die ermittelte unterschiedlich starke Fusionsinhibierung könnte demnach auch durch eine unterschiedlich starke Inhibierung des viralen „attachment“ begründet sein. Mit Hilfe eines modifizierten „Attachment“-Assay konnte geprüft werden, welche Phase der Virus-Wirtszell-Interaktion durch die gB-spezifische AK beeinflusst wurde. Keiner der gB-spezifischen AK inhibierte die initiale Bindung des Virus an HSPGs (s. Abb. 33 A/B), so dass die unterschiedlich starke Fusionsinhibierung nicht durch geringere Virus-Adsorption in Anwesenheit von gB-AK erklärt werden konnte. Für den AK ITC 52, der die Fusion um etwa 60% inhibierte, konnte im Gegenteil, in zwei unabhängigen Versuchsansätzen,

eine bessere Virus-Adsorption beobachtet werden. Dieses Phänomen, dass in der Literatur als „antibody-dependent enhancement of infectivity“ (ADE) beschrieben wird, konnte ebenfalls für den Kontrollantikörper Mo58, sowie für die AK ITC 33, 39 und 48 beobachtet werden (s. Abb. 33 A/B). Dabei kann die Bindung des antikörpergebundenen Virus entweder über Fc-Rezeptoren oder über Komplement-Rezeptoren stattfinden und so die Infektiösität des Virus gesteigert werden (Dimmock, 1993). Die verbesserte Virus-Adsorption in Anwesenheit der o.g. AK auf humanen Astrocytomazellen, könnte demnach durch konstitutiv exprimierte Komplementrezeptoren wie C3aR und C5aR (Sayah *et al.*, 1999), ausgelöst worden sein.

Entscheidend für das durchgeführte Experiment war jedoch, dass bei einer IgG-Konzentration von 6,2 µg/ml Fusionsinhibierung, nicht aber eine Inhibierung der Virus-Adsorption über HSPGs stattfand.

Die initiale niederaffine Bindung des Virus an HSPGs, die durch Konkurrenz mittels Heparin wieder gelöst werden kann, konvertiert innerhalb von Minuten zu einer hochaffinen nicht reversiblen Bindung, die vermutlich durch die Interaktion von viralen Glykoproteinen und zellulären Rezeptorproteinen verursacht wird (Compton *et al.*, 1992). Um zwischen HSPG-Bindung und Rezeptorbindung zu differenzieren und Aussagen hinsichtlich der Rezeptorbindung in Anwesenheit gB-spezifischer AK treffen zu können, wurde der „Attachment“-Assay weiter modifiziert, so dass durch Konkurrenz mittels Heparin nach erfolgter Virus-Adsorption rezeptorgebundenes Virus detektiert werden konnte. Für den getesteten Kontrollantikörper Mo58, sowie für die AK ITC 33, 52, 66B konnte auch hier eine leicht verbesserte Rezeptorbindung beobachtet werden, während für den AD2 spezifische AK ITC 88 eine um etwa 30% verminderte Rezeptorbindung festgestellt wurde (s. Abb. 34).

Die Anlagerung des ITC 88 an die antigene Domäne 2 des gB führte offenbar zu einer verminderten Rezeptorbindung des Virions. Die Tatsache, dass die Rezeptorbindung nur um etwa 30% durch den gB-spezifischen AK ITC 88 inhibiert wurde, spricht dafür, dass neben dem Glykoprotein B weitere Glykoproteine an der Rezeptorbindung beteiligt sein müssen.

6.5 Untersuchung des rekombinanten AD2-Epitops

Die antigene Domäne 2 (AD2) umfasst im N-terminalen Bereich des HCMV gB die AS 67-86 (Ohlin *et al.*, 1993). Die solitäre Expression der AD2 sollte die Frage nach einer direkten oder indirekten Beteiligung dieser Domäne an der Rezeptorbindung klären. Durch Expression der AD2 als GST-Fusionsprotein sollte zudem eine spätere Identifizierung potentieller zellulärer Rezeptoren ermöglicht werden. Voraussetzung für diese Untersuchungen war der Nachweis der spezifischen Bindung der AD2 an Zelloberflächen-Proteine der verwendeten U373-Zellen. Die spezifische Bindung des bakteriell exprimierten und affinitätsgereinigten GST-AD2-Fusionsprotein an U373-CAT/VP16 Zellen wurde mittels Oberflächen-Immunfluoreszenz nachgewiesen (s. Abb. 38), jedoch führte die GST-AD2 Bindung bei den gewählten Proteinkonzentrationen von 45-180 µg/Well zu keiner signifikanten Inhibierung der HCMV-vermittelten Zell-Zell-Fusion. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Proteinkonzentrationen des AD2-Fusionsproteins im Bereich von 1-6 µM nicht ausreichend für eine messbare Rezeptorinhibierung waren. Jedoch führte auch die Untersuchung mittels synthetischer Peptide (100 µM), die den Bereich der AD2 abdeckten, zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Absättigung potentieller Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Peptide ist in der Literatur z.B. u.a. für das HIV beschrieben (Sébastien *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2000). Die ermittelten Peptid-Konzentrationen zur Inhibierung der Rezeptorbindung für diese Viren lagen im Bereich von etwa 1µM, so dass aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die direkte Interaktion der AD2 mit dem potentiellen Wirtszellrezeptor eher unwahrscheinlich ist. Dennoch ist eine Beteiligung der AD2 des gB an der Virus-Adsorption nicht ausgeschlossen. Die Interaktion der AD2 z.B. mit einem Corezeptor könnte die ermittelte spezifische Bindung der AD2 an Zelloberflächenproteinen der U373-Zellen erklären.

6.6 AD2 und fusionsaktive Konformation des HCMV-gB

Die derzeitige Vorstellung zur pH unabhängigen Membranfusion bei Herpesviren geht von einer Aktivierung des Fusionsprozesses durch Protein-Protein-Interaktionen aus. Vermutlich führt die rezeptorvermittelte Bindung viraler Glykoproteine zu Konformationsänderungen und zur Exposition eines internen Fusionspeptids oder einer fusogenen Domäne. Im Falle von HSV 1 ist die Rezeptorbindung Glykoprotein D vermittelt. Das gD selbst ist jedoch nicht fusionsaktiv (Spear, 2001), so dass möglicherweise nach erfolgter Rezeptorbindung eine Protein-Protein-Interaktion mit gB oder gH/gL zu entsprechenden Konformationsänderungen und der Aktivierung fusogener Domänen führt (Spear, 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse, sowie die Tatsache, dass die AD2 Sequenz keine für Rezeptorbindungs-Domänen typische Struktur aufweist, sprechen für die Vermutung, dass das AD2 Epitop möglicherweise in der Nähe einer rezeptorbindenden Domäne lokalisiert ist und durch die Antikörperbindung die Rezeptorbindung sterisch beeinträchtigt wird. Die der Rezeptorbindung folgende Konformationsänderung des Proteins, die zur fusionsaktiven Form führt, findet infolge dessen nicht statt. Das von Bold *et al.*, 1996 beschriebene potentielle interne Fusionspeptid des HCMV Glykoproteins B könnte bei diesem Vorgang eine zentrale Rolle spielen. Darüber hinaus könnte durch die AK-Bindung an der AD2 auch die Konformation des gB-Moleküls so verändert werden, dass eine Interaktion mit anderen fusionsrelevanten Glykoproteinen, wie gH/gL (Milne *et al.*, 1998), unterbunden wird.

6.7 Ausblick

Der hier vorgestellte CAT-Reportergen-Aktivierungs-Assay ermöglicht die Untersuchung der virusvermittelten Zell-Zell-Fusion und wurde erfolgreich anhand HCMV-induzierter Zell-Zell-Fusion etabliert. Er eröffnet somit die Möglichkeit anhand von Virusmutanten, die gezielte Mutationen oder Deletionen in potentiell fusogenen Glykoproteinen aufweisen, die am Fusionsvorgang beteiligten Glykoproteine zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die Methoden für die gezielte und effiziente Herstellung geeigneter Virusmutanten stehen seit kurzem auch für das komplexe HCMV zur Verfügung (Borst *et al.*, 1999; Strive *et al.*, 2002).

Ebenso kann der Fusions-Assay für die Untersuchung anderer (Herpes)-Viren, die Zell-Zell-Fusionen induzieren, z.B. des HSV, eingesetzt werden. Voraussetzung ist natürlich die Permissivität der im Assay verwendeten Zellen. Der Fusions-Assay erwies sich als geeignet zur Untersuchung der Fusions-Inhibierung mittels Glykoprotein-spezifischer Antikörper, so dass sich weiterhin die Untersuchung von Patientenseren hinsichtlich ihres Gehalts an fusions-inhibierenden Antikörpern anbietet. Es ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, dass die gB- und gH-spezifischen Antikörper in HCMV-Patientenseren variabel sind und voneinander unabhängige Konzentrationen aufweisen. Es wäre hier z.B. interessant zu prüfen, ob die unterschiedlichen Antikörperprofile der Seren in Beziehung zur Hemmung der HCMV-vermittelten Fusion stehen. Die Untersuchung von Antikörperprofilen verschiedener Patientengruppen u.a. mittels Fusions-Assay könnte so zum Verständnis der Pathogenese von HCMV-Infektionen beitragen.

7 Zusammenfassung

Die initialen Virus-Wirtszell-Interaktionen des HCMV, die Adsorption des Virus an die Wirtszellmembran und die anschließende Fusion von Virus- und Plasmamembran (Penetration), sind komplexe Vorgänge, die durch die in der viralen Hülle integrierten Glykoproteine vermittelt werden. Bisher konnten für das HCMV sechs Membranglykoproteine, gB, gH, gL, gM, gN, gO beschrieben werden, die auf der Virusoberfläche in Form hochmolekularer Komplexe organisiert sind. Klare Aussagen über die Beteiligung einzelner Glykoproteine an der viralen Adsorption und pH-unabhängigen Fusion werden dadurch erschwert, dass die Prozesse nicht unabhängig voneinander ablaufen und vermutlich einige Glykoproteine an beiden Prozessen beteiligt sind.

Grundlage zur Untersuchung der herpesviral-vermittelten Fusion war ein neu etabliertes Meßsystem, mit dem virusinduzierte Fusion eindeutig nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des neuen Reporter-gen-Aktivierungs-Assays die HCMV-vermittelte Zell-Zell-Fusion in U373-Zellen spezifisch ermittelt und quantifiziert. Das Ausmaß an virusinduzierter Zell-Zell-Fusion wird dabei zuverlässig in Reporter-CAT-Aktivität übersetzt und mittels CAT-Assay nachgewiesen.

Mit Hilfe dieses Fusions-Assay konnte gezeigt werden, dass (I) die Fusionsaktivität durch die in der viralen Hüllmembran inserierten Glykoproteine vermittelt wird. Mittels neutralisierender Antikörper konnte die virusinduzierte Zell-Zell-Fusion eindeutig inhibiert werden und die Beteiligung der Glykoproteine B und H am viralen Fusionsvorgang belegt werden.

(II) Andererseits konnte in transienten Ansätzen gezeigt werden, dass sowohl solitär exprimiertes Glykoprotein B und H/L, als auch die coexprimierten Glykoproteine B, H/L, im Gegensatz zum Herpes-Simplex Virus-System, für die Induktion der Zell-Zell-Fusion nicht hinreichend sind.

(III) Fusionsinhibierungsexperimente ergaben, dass Antikörper gegen die in der Literatur als immundominant beschriebene antigene Domäne 1 des gB die HCMV-vermittelte Fusion nicht vollständig inhibierten, während ein AD2 spezifischer Antikörper zur vollständigen Inhibierung der Zell-Zell-Fusion führte. Keiner der neutralisierenden gB-spezifischen Antikörper inhibierte die initiale, niederaffine Bindung des Virus an Heparan-Sulfat-Proteoglykanen der Plasmamembran.

(IV) Die Untersuchungen zur spezifischen Rezeptorbindungsfähigkeit des gB ergaben, dass die Antikörper-Bindung des AD2 spezifischen Antikörpers zu einer verminderten Rezeptorbindung führte.

Durch die solitäre Untersuchung der antigenen Domäne 2 konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass eine direkte Interaktion zwischen der AD2 und dem potentiellen gB-Rezeptor stattfindet, sondern durch die Antikörper-Bindung an der AD2 vermutlich die Konformation des gB verändert wird, so dass sowohl die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor, vor allem aber die Ausbildung der fusionsaktiven Konformation beeinträchtigt wird.

8 Literaturverzeichnis

- Anderson, R.A & Gompels, U.A.** (1999). N- and C-terminal external domains of human herpesvirus-6 glycoprotein H affect a fusion-associated conformation mediated by glycoprotein L binding the N terminus.
J. Gen. Virol. **80**, 1485-94.
- Armstrong, S.J., McInerney, T.L., McLain, L., Wahren, B., Hinkula, J., Levi, M. & Dimmock, N.J.** (1996). Two neutralizing anti-V3 monoclonal antibodies act by affecting different functions of human immunodeficient virus type 1.
J. Gen. Virol. **77**, 2931-41
- Baines, J.D. & Roizman, B.** (1993). The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells.
J. Virol. **67**, 1441-52
- Baldick, C.J.Jr. & Shenk, T.** (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles.
J. Virol. **70**, 6097-105
- Baldwin, B.R., Zhang, C.-O. & Keay, S.** (2000). Cloning and epitope mapping of a functional partial fusion receptor for human cytomegalovirus gH.
J. Gen. Virol. **81**, 27-35
- Basgoz, N., Quadri, I., Navarro, D., Sears, A., Lennette, E., Youngblom, J. & Pereira, L.** (1992). The amino terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains.
J. Gen. Virol. **73**, 983-88
- Bello C. & Whittle, H.** (1991). Cytomegalovirus infection in gambian mothers and their babies.
J. Clin. Pathol. **44**, 366-69
- Bogner, E., Radsak, K., & Stinski, M.F.** (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity.
J. Virol. **72**, 2259-64
- Bogner, E., Reschke, M., Reis, B., Reis, E., Britt, W. & Radsak, K.** (1992). Recognition of compartmentalized intracellular analogs of glycoprotein H of human cytomegalovirus.
Arch. Virol. **126**, 67-80
- Bold, S.** (1997). Lokalisation fusionsrelevanter Domänen des Glykoprotein B des Humanen Cytomegalievirus.
Doktorarbeit am Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K.** (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion.
J. Gen. Virol. **77**, 2297-302

- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H. & Messerle, M.** (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants.
J. Virol. **73**, 8320-9
- Boyle, K.A. & Compton, T.** (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B.
J. Virol. **72**, 1826-33
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72**, 248-54
- Britt, W.J.** (1984). Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus.
Virology **135**, 369-78
- Britt, W.J., Vulger, L., Butfiloski, E.J. & Stephens, E.B.** (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response.
J. Virol. **64**, 1079-85
- Britt, W.J., Pass, R.F., Stagno, S. & Alford, C.A.** (1991). Pediatric cytomegalovirus infection.
Transplant. Proc. **23**, Suppl. 3, 115-17
- Britt, W.J. & Vugler, L.G.** (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex B (gp55-116).
J. Virol. **66**, 6747-54
- Britt, W.J. & Alford, C.A.** (1996). Cytomegalovirus. In Fields *Virology*, 3rd Ed.
- Britt, W.J. & Mach, M.** (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins.
Intervirology **39**, 401-12
- Browne, H., Bruun, B. & Minson, T.** (2001). Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL.
J. Gen. Virol. **82**, 1419-22
- Bullock, W.O., Fernandez, J.-M. & Short, J.M.** (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection.
BioTechniques **5**, 376-78
- Butcher, M., Raviprakash, K. & Ghosh, H.P.** (1990). Acid pH-induced fusion of cells by herpes simplex virus glycoproteins gB and gD
J. Biol. Chem. **265**, 5862-8
- Campadelli-Fiume, G., Avitabile, E., Fini, S., Stirpe, D., Arsenakis, M. & Roizman, B.** (1988). Herpes simplex virus glycoprotein D is sufficient to induce spontaneous pH-independent fusion in a cell line that constitutively expresses the glycoprotein.
Virology **166**, 598-602

- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. & Kim, P.S.** (1997). Core structure of gp41 from the envelope glycoprotein.
Cell **89**, 263-73
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. & Moore, P. S.** (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.
Science **266**, 1865-69
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A. 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Westom, K.M. & Barrell, B.G.** (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **154**, 125-69
- Choe, H., Farazan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N. & Sodroski, J.** (1996). The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.
Cell **85**, 1135-48
- Cohen, F.S. & Melikyan, G.B.** (1998). Methodologies in the study of cell-cell-fusion.
Methods **16**, 215-26
- Compton, T., Nepumoceno, R.R. & Nowlin, D.M.** (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface.
Virology **191**, 387-95
- Compton, T., Nowlin, D.M. & Cooper, N.R.** (1992). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.
Virology **193**, 834-41
- Cranage, M.P., Smith, G.L., Bell, S.E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A.T., Tomlinson, P., Barrell, B.G. & Minson, T.C.** (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H.
J. Virol. **62**, 1416-22
- Dijkstra, J.M., Visser, N., Mettenleiter, T.C. & Klupp, B.G.** (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component.
J. Virol. **70**, 5684-88
- Dimmock, N.J.** (1993). Neutralization of animal viruses. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* **183**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Doerr, H.W.** (1987). Cytomegalovirus infection in pregnancy.
J. Virol. Methods **17**, 127-32
- Drew, W.L.** (1992). Cytomegalovirus infection in patients with AIDS.
Clin. Infect. Dis. **14**, 608-15

- Dumas, A.M., Geelen, J.L., Maris, W. & Van der Noordaa, J.** (1980). Infectivity and molecular weight of Varicella-zoster virus.
J. Gen. Virol. **47**, 233-35
- Dutch, R.E., Bruckner, R.C., Mocarski, E.S. & Lehman, I.R.** (1992). Herpes simplex virus type 1 recombination: role of DNA replication and viral a sequences.
J. Virol. **47**, 421-33
- Eickmann, M., Lange, R., Ohlin, M., Reschke, M. & Radsak, K.** (1998). Effect of cystein substitutions on dimerisation and interfragment linkage of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55).
Arch. Virol. **143**, 1865-80
- Epstein, M., Henle, W., Achoing, B. & Barr, Y.** (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.
J. Exp. Med. **121**, 761-70
- Farrar, G.H. & Greenaway, P.J.** (1986). Characterization of glycoprotein complexes present in human cytomegalovirus envelopes.
J. Gen. Virol. **67**, 1469-73
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M.** (1987). Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7413-17
- Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C. & Nelson, J.A.** (1998). Steady-state plasma membrane expression of human cytomegalovirus gB is determined by the phosphorylation state of Ser₉₀₀
J. Virol. **72**, 6657-64
- Foster, T.P., Melancon, J.M. & Kousoulas, G.** (2001). An α -helical domain within the carboxyl terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB) is associated with cell fusion and resistance to heparin inhibition of cell fusion.
Virology **287**, 18-29
- Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffmann, E., Danovich, R.M. & June, C. H.** (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 748-52
- Gallwitz, D., Bos, E. & Stahl, H.** (1978). Translation of HeLa cell histone messenger RNAs in cell free protein synthesizing systems from rabbit reticulocytes, HeLa cells, and wheat germ.
Methods Cell Biol. **19**, 197-213
- Gibson, W. & Irmiere, A.** (1984). Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines.
Birth Defects Orig Artic Ser **20**, 305-24
- Gicklhorn, D., Eickmann, M. & Radsak, K.** (1999). Chloramphenicol acetyltransferase expression as a sensor for fusion activity
Biotechniques **27**, 902-8

- Gonczol, E. deTaisne, C., Hirka, G., Berencsi, K., Lin, W.C., Paoletti, E. & Plotkin, S.** (1991). High expression of human cytomegalovirus (HCMV)-gB protein in cells infected with vaccinia-gB-recombinant: the importance of the gB protein in HCMV immunity.
Vaccine **9**, 631-37
- Grodberg, J. & Dunn, J.J.** (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification.
J. Bacteriol. **170**, 1245-53
- Grundy, J.E., Mc Keating, J.A., Ward, P.J., Sanderson, A.J. & Griffith, P.D.** (1987). β 2-microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor.
J. Gen. Virol. **68**, 793-803
- Gruter, W.** (1924). Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung.
Muench. Med. Wochenschr. **71**, 1058-60
- Gupta, P., St Jeor, S. & Rapp, F.** (1977). Comparison of the polypeptides of several strains of human cytomegalovirus.
J. Gen. Virol. **34**, 447-54
- Herold, B.C., Vissalli, R.J., Susmarski, N., Brandt, C.R. & Spear, P.G.** (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulfate and glycoprotein B.
J. Gen. Virol. **75**, 1211-22
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1997). Characterization of a novel third member of the human cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex.
J. Virol. **71**, 5391-98
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex.
J. Virol. **72**, 8191-97
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1999). Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus.
J. Virol. **73**, 3886-92
- Jons, A., Granzow, H., Kuchling, R. & Mettenleiter, T.C.** (1996). The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope.
J. Virol. **70**, 1237-41
- Kari, B. & Gehrz, R.** (1991). Biochemical and immunological analysis of discontinuous epitopes in the family of human cytomegalovirus glycoprotein complexes designated gC-I.
J. Gen. Virol. **72**, 1975-83
- Kari, B. & Gehrz, R.** (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope.
J. Virol. **66**, 1761-64

- Kari, B., Radeke, R. & Gehrz, R.** (1992). Processing of human cytomegalovirus envelope glycoproteins in and egress of cytomegalovirus from human astrocytoma cells.
J. Gen. Virol. **73**, 253-60
- Kari, B. & Gehrz, R.** (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human glycoprotein complex designated gC-II.
J. Gen. Virol. **74**, 255-64
- Kaye, J.F., Gompels, U.A. & Minson, A.C.** (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with HCMV UL115 gene product.
J. Gen. Virol. **73**, 2693-98
- Keay, S., Merigan, T. & Rasmussen, L.** (1989). Identification of cell surface receptors for the 86- kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus.
Pro. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 10100-103
- Keay, S. & Baldwin, B.** (1991). Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment.
J. Virol. **65**, 5124-28
- Kemble, G.W., Danieli, T. & White, J.** (1994). Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion.
Cell **76**, 383-91
- Khyse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Bio. Biophys. Meth. **10**, 203-09
- Kniess, N., Mach, M., Fay, J. & Britt, W.J.** (1991). Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus.
J. Virol. **65**, 138-46
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. & Hendrickson, W.A.** (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.
Nature **393**, 648-59
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-85
- Lake, C.M., Molesworth, S.J. & Hutt-Fletcher, L.M.** (1998). The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3.
J. Virol. **72**, 5559-64
- Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi, R. & Glorioso, J.C.** (1998). Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoprotein B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread.
J. Virol. **72**, 6119-30

- Lee, S.K., Compton, T. & Longnecker, R.** (1997). Failure to complement infectivity of EBV and HSV-1 glycoprotein B (gB) deletion mutants with gBs from different human herpesvirus subfamilies.
Virology **237**, 170-81
- Lindquester, G.J. & Pellett, P.E.** (1991). Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G+C content, length and the presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements.
Virology **182**, 102-10
- Liu, B & Stinski, M.F.** (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis acting elements.
J. Virol. **66**, 4434-44
- Lurain, N.S., Thompson, K.D., Holmes, E.W. & Read, G.S.** (1992). Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents.
J. Virol. **66**, 7146-52.
- Lussenhop, N.O., Goertz, R., Wabuke-Bunoti, M., Gehrz, R. & Kari, B.** (1988). Epitope analysis of human cytomegalovirus glycoprotein complexes using murine monoclonal antibodies.
Virology **164**, 362-72
- Lycke, E., Johansson, M., Svennerholm, B. & Lindahl, U.** (1991). Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process.
J. Gen. Virol. **72**, 1131-37
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P. & Britt, W.** (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gp UL73).
J. Virol. **74**, 11881-92
- Mardberg, K., Trybala, E., Glorioso, C. & Bergström, T.** (2001). Mutational analysis of the major heparan sulfate-binding domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C.
J. Gen. Virol. **82**, 1941-50
- Maresova, L., Pasieka, T.J. & Grose, C.** (2001). Varicella-zoster virus gB and gE coexpression, but not gB or gE alone, leads to abundant fusion and syncytium formation equivalent to those from gH and gL coexpression.
J. Virol. **75**, 9483-92
- Marschall, G.S., Rabalais, G.P., Stout, G.G. & Waldeyer, S.L.** (1992). Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity.
J. Infect. Dis. **165**, 381-84
- Matthews, T. & Boehme, R.** (1988). Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir.
Rev. Infect. Dis. **10**, Suppl 3, 490-94

- McVoy, M.A. & Adler, S.P.** (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer.
J. Virol. **68**, 1040-51
- Meyer, H., Sundqvist, V.-A., Pereira, L. & Mach, M.** (1992). Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain common and strain-specific antibodies.
J. Gen. Virol. **73**, 2375-83
- Michel, D., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., Heuschmid, M., Simoncini, L., Mühlberger, D., Zimmermann, A., Pavic, I. & Mertens, T.** (1998). Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself.
J. Gen. Virol. **79**, 2105-12
- Milne, R.S.B., Paterson, D.A. & Booth, J. C.** (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein H/ glycoprotein L complex modulates fusion-from-without.
J. Gen. Virol. **79**, 855-65
- Moore, J.P., Jameson, B.A., Weiss, R.A. & Sattentau, Q.J.** (1993). The HIV-cell fusion reaction. In: Viral Fusion Mechanisms, 233-89
Bentz, J. Boca Raton: CRC Press
- Muggeridge, M.I.** (2000). Characterization of cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus 2 glycoproteins gB, gD, gH and gL in transfected cells.
J. Gen. Virol. **81**, 2017-27
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. **155**, 335-50
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J. & Pereira, L.** (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell and fusion of infected cells.
Virology **197**, 143-58
- Norton, W.T., Abe, T., Poduslo, S.E. & DeVries, G.H.** (1975). The lipid composition of isolated brain cells and axons.
J. Neurosci. Res. **1**, 57-75
- Ohlin, M., Sundqvist, V.-A., Mach, M., Wahren, B. & Borrebaeck, C.A.K.** (1993). Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies.
J. Virol. **67**, 703-10
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U. & Helenius, A.** (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro.
Mol. Cell. Biol. **20**, 4922-31
- Oram, R.J. & Herold, B.C.** (1998). Antiviral agents for herpes virus.
Pediatr. Infect. Dis. **17**, 652-53

- Osterrieder, N., Neubauer, A., Fakler, B., Brandmuller, C., Seyboldt, C., Kaaden, O.R. & Baines, J.D.** (1997). Synthesis and processing of the equine herpesvirus 1 glycoprotein M.
Virology **232**, 230-39
- Pertel, P.E., Fridberg, A., Parish, M.L. & Spear, P.G.** (2001). Cell fusion by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate.
Virology **279**, 313-24
- Phillips, T.A., Van Bogelen, R.A. & Neidhardt, F.C.** (1984). lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein.
J. Bacteriol. **159**, 283-7
- Pietropaolo, R. & Compton, T.** (1999). Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells.
J Gen Virol. **80**, 1807-16
- Platt, E.J., Kuhlmann, S.E., Rose, P.P. & Kabat, D.** (2001). Adaptive mutations in the V3 loop of gp120 enhance fusogenicity of human immunodeficiency virus type 1 and enable use of a CCR5 coreceptor that lacks the aminoterminal sulfated region.
J. Virol. **75**, 12266-278
- Prentice, H.G.** (1989). Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus infection in the bowne marrow transplant recipient.
J. Antimicrob. Chemother. **23**, Suppl. E, 23-30
- Quadri, I., Navarro, D., Paz, P. & Pereira, L.** (1992). Assembly of conformation-dependent neutralizing domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus.
J. Gen. Virol. **73**, 2913-21
- Radsak, K., Wiegand, T.H., Unterhöfer, G., Wagner, C. & Kaiser, C.J.** (1985). Sodium butyrate selectively inhibits host cell glycoprotein synthesis in human fibroblasts infected with Cytomegalovirus.
Biosci. Rep. **5**, 589-99
- Radsak, K., Brücher, K.H., Britt, W., Shiou, H., Schneider, D. & Kollert, A.** (1990). Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus.
Virology **177**, 515-22
- Radsak, K.D., Brücher, K.H. & Georgatos, S.D.** (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus.
Eur.J. Cell Biol. **54**, 299-304
- Radsak, K., Kern, H., Reis, B., Reschke, M., Mockenhaupt, T. & Eickmann, M.** (1995). Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. In: Friedmann, H., Barbanti-Brodano, G. (Eds): *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*. Plenum Press, New York, 295-312
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A. & Reschke, M.** (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment.
Arch. Virol. **141**, 557-72

- Reis, B., Bogner, E., Reschke, M., Richter, A., Mockenhaupt, T. & Radsak, K.** (1993). Stable constitutive expression of glycoprotein B (gpUL55) of human cytomegalovirus in permissive astrocytoma cells.
J. Gen. Virol. **74**, 1371-79
- Reschke, M.** (1990). Prokaryotische und eukaryotische Expression eines viralen Glykoproteins. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Phillips-Universität Marburg.
- Reschke, M., Reis, B., Nöding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W. & Radsak, K.** (1995). Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains.
J. Gen. Virol. **76**, 113-22
- Rizzuto, C.D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A. & Sodroski, J.** (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding.
Science **280**, 1949-53
- Roizmann, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., Dethe, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. & Wolf, K.** (1981). Herpesviridae definition, provisorial nomenclature and taxonomy.
Intervirology **16**, 201-17
- Roizman, B., Desroisiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C. & Studdert, M.** (1992). The family herpesviridae: an update.
Arch. Virol. **123**, 425-49
- Rose, J.K., Buonocore, L. & Whitt, M.** (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells.
BioTechniques **10**, 520-25
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-67
- Sayah, S., Ischenko, A.M., Zhakhov, A., Bonnard, A.S. & Fontaine, M.** (1999). Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression
J. Neurochem. **72**, 2426-36
- Scheffczik, H., Kraus, I., Kiermexer, S., Bogner, E., Holzenburg, A., Garten, W. & Eickmann, M.** (2001). Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B.
FEBS Lett. **506**, 113-16
- Schneweis, K.E.** (1962). Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis.
Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther. **124**, 24-48

- Schoppel, K., Hassfurth, E., Britt, W., Ohlin, M., Borrebaeck, C.A. & Mach, M.** (1996). Antibodies specific for the antigenic domain 1 (AD-1) of glycoprotein B (gpUL55) of human cytomegalovirus bind to different substructures.
Virology **216**, 133-45
- Schoppel, K., Kropff, B., Schmidt, C., Vornhagen, R. & Mach, M.** (1997). The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein specific antibodies.
J. Infect. Dis. **175**, 533-44
- Sébastien, N., Krust, B., Callebaut, C., Guichard, G., Muller, S., Briand, J.-P. & Hovanessian, A.G.** (2000). The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans.
J. Biol. Chem. **274**, 27875-884
- Shieh, M.T., WuDuun, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D. & Spear, P.G.** (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans.
J. Cell. Biol. **116**, 1273-81.
- Shukla, D. & Spear, P.G.** (2001). Herpesvirus and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry.
J. Clin. Invest. **108**, 503-10
- Silver, P.A., Keegan, L.P. & Ptashine, M.** (1984). Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5951-5
- Simpson, J. A., Chow, J. C., Baker, J., Avdalovic, N., Yuan, S., Au, D., Co, M.S., Vasquez, M., Britt, W.J. & Coelingh, K.L.** (1993). Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites.
- Smith, M.G.** (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **92**, 224-30
- Smuda, C., Bogner, E., & Radsak, K.** (1997). The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle.
J. Gen. Virol. **78**, 1981-92
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. & Helenius, A.** (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.
J. Cell. Biol. **136**, 1007-21
- Söderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M. & Möller, E.** (1993). CD13 (human aminopeptidase-N) mediates human cytomegalovirus infection.
J. Virol. **67**, 6576-85
- Spaete, R.R., Perot, K., Scott, P.I., Nelson, J.A., Stinski, M.F. & Pachi, C.** (1993). Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with the UL115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface.
Virology **193**, 853-61

- Spear, P.G.** (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells.
Seminars in Virology **4**, 167-80
- Spear, P.G., Eisenberg, R.J. & Cohen, G.H.** (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry.
Virology **275**, 1-8
- Spear, P.G.** (2001). A first step toward understanding membrane fusion induced by herpes simplex virus.
Mol. Cell **8**, 169-79
- Speck, R.F., Wehrly, K., Platt, E.J., Atchison, R.E., Charo, I.F., Kabat, D., Chesebro, B. & Goldsmith, M.A.** (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop.
J. Virol. **71**, 7136-39
- Speckner, A., Glykofrydes, D., Ohlin, M. & Mach, M.** (1999). Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization.
J. Gen. Virol. **80**, 2183-91
- Speckner, A., Kropff, B., Knör, S. & Mach, M.** (2000). The antigenic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B contains an intramolecular disulfide bond.
J. Gen. Virol. **81**, 2659-63
- Strive, T., Borst, E., Messerle, M. & Radsak, K.** (2000). Phänotypische Komplementation eines essentiellen Glykoproteins des humanen Cytomegalievirus (HCMV).
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Wien
- Strive, T., Borst, E., Messerle, M. & Radsak, K.** (2002). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B is dispensable for viral growth in culture.
J. Virol. **76**, 1252-64
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. **189**, 113-30
- Sullivan, V., Talaricio, C.,L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M. & Biron, K.K.** (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells.
Nature **359**, 85
- Tamm, L.K. & Han, X.** (2000). Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes.
Biosci. Rep. **20**, 501-18
- Theiler, R.N. & Compton, T.** (2001). Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O.
J Biol Chem. **276**, 39226-31

- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H.** (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes.
Eur. J. Cell Biol. **60**, 163-78
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J. & Moore, J.P.** (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its coreceptor CCR-5.
Nature **384**, 184-87
- Trybala, E., Bergström, T., Svennerholm, B., Jeansson, S., Glorioso, J.C. & Olofsson, S.** (1994). Localization of the functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulfate.
J. Gen. Virol. **75**, 743-52
- Tugizov, S., Navarro, D., Paz, P., Wang, Y., Qadri, I. & Pereira, L.** (1994). Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: Syncytium formation in cells, constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies.
Virology **201**, 263-76
- Tugizov, S., Maidjii, E., Xiao, J. & Pereira, L.** (1999). An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane.
J. Virol. **73**, 8677-88
- Turner, A., Bruun, B., Minson, T. & Browne H.** (1998). Glycoproteins gB, gD and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a cos cell transfection system.
J. Virol. **72**, 873-75
- Urban, M., Klein, M., Britt, W.J., Hassfurth, E. & Mach, M.** (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response.
J. Gen. Virol. **77**, 1537-47
- Vey, M., Schäfer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk H.-D. & Radsak, K.** (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin.
Virology **206**, 746-49
- Wagner, B., Kropff, B., Kalbacher, H., Britt, W., Sundqvist, V.-A., Ostberg, L. & Mach, M.** (1992). A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus.
J. Virol. **66**, 5290-97
- Weisenborn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. & Willey, D.C.** (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Nature **387**, 426-30
- White, J.M.** (1990). Membrane fusion.
Science **258**, 917-24

- Winkler, M., Rice, S.A. & Stamminger, T.** (1994). UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression.
J. Virol. **68**, 3943-54
- Winkler, M., Schmolke, S., Plachter, B. & Stamminger, T.** (1995). The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the immediate-early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82).
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. **99**, 8-9
- Wright, H.T. Jr., Goodheart, C.R. & Lielausis, A.** (1964). Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining.
Virology **23**, 419-24
- Wright, J.F., Kurosky, A. & Wasi, S.** (1994). An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **198**, 983-89
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W. Gerard, C. & Sodroski, J.** (1996). CD 4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5.
Nature **384**, 179-83
- WuDunn, D. & Spear, P.G.** (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate.
J. Virol. **63**, 52-58
- Wyatt, R. & Sodroski, J.** (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens.
Science **280**, 1884-88
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**, 103-19
- Zou, M.X., Liu, H.Y., Haraguchi, Y., Soda, Y., Tatemoto, K. & Hoshino, H.** (2000). Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV).
FEBS Lett. **473**, 15-8

9 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BGH	bovines Wachstumshormon
cpm	Zerfälle pro Minute
DC	Dünnschicht- Chromatographie
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocynat
GST	Gluthathion-S-Transferase
h p.i.	Stunden nach Infektion
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
CAMP	Chloramphenicol
i.E.	infektiöse Einheiten
IU	internationale Einheiten
mab	monoklonaler Antikörper
moi	Multiplizität der Infektion (i.E./Zelle)
pab	polyklonaler Antikörper
PEG	Polyethylenglykol
RT	Raumtemperatur
SV40	Simian Virus 40
ÜN	über Nacht

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Radsak für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas sowie für die außerordentlich engagierte fachliche wie persönliche Betreuung während meiner Arbeit.

Für die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Biologie möchte ich mich des weiteren ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl bedanken.

Für die hilfreichen Diskussionen und die experimentellen Hilfestellungen sowie die Überlassung des Wortes "Schnuffi" möchte ich mich ganz besonders bei Markus Eickmann bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie danke ich für ihre stetige Unterstützung und Anteilnahme während der Anfertigung meiner Arbeit.

.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation "Untersuchung zur pH-unabhängigen Membranfusion des Humanen Cytomegalievirus" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 11.02.2002

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Dorothee Gicklhorn
Adresse:	Weiershäuserstr. 13 35096 Weimar
Geburtsdatum:	7. September 1969
Geburtsort:	Marburg a.d. Lahn
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

<u>Schulbildung:</u>	1976-1981	Grundschule und Förderstufe der Freiherr- vom- Stein- Schule, Gladenbach
	1982-1989	Gymnasiale Oberstufe der Freiherr- vom- Stein- Schule, Gladenbach
	Mai 1989	Allgemeine Hochschulreife
<u>Berufsausbildung:</u>	Januar 1990- Dezember 1991	BTA-Schule an der Deutschen Angestellten Akademie, Marburg
<u>Berufsabschluß:</u>	Dezember 1991	Biologisch-Technische-Assistentin
<u>Berufstätigkeit:</u>	März 1992- September 1992	Technische Assistentin am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg
<u>Universität:</u>	WS 1992/93	Beginn des Studiengang Diplom-Biologie an der Philipps-Universität, Marburg
	November 1994	Diplom-Vorprüfung
	Oktober 1996	Mündlichen Diplomprüfungen im Hauptfach Mikrobiologie und in den Nebenfächern Genetik, Virologie und Immunologie
	Dezember 1996- Dezember 1997	Diplomarbeit am Institut für Virologie unter der Leitung von Prof. Dr. K. Radsak

Januar 1998-
Juni 1998

Wissenschaftliche Hilfskraft am
Institut für Virologie, Marburg.
Beginn der Doktorarbeit unter der
Leitung von Herrn Prof. Dr. K.
Radsak

Juli 1998-
Juni 1999

Technische Assistentin am Institut
für Virologie, Marburg

Juli 1999 -
Juni 2001

Promotionsstipendium des Landes
Hessen zur Förderung von
Nachwuchswissenschaftlern

Juli-2001 -
Februar 2002

Wissenschaftliche Angestellte
am Institut für Virologie, Marburg